



# Synthèse d'esters de l'acide benzoïque par catalyse enzymatique en milieu hétérogène microaqueux

Jean-Pierre Leszczak

## ► To cite this version:

Jean-Pierre Leszczak. Synthèse d'esters de l'acide benzoïque par catalyse enzymatique en milieu hétérogène microaqueux. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1998. Français. NNT : 1998INPG4201 . tel-00841819

**HAL Id: tel-00841819**

**<https://theses.hal.science/tel-00841819>**

Submitted on 5 Jul 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE  
DES MINES DE SAINT-ETIENNE**

**INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE GRENOBLE**

n° d'ordre : 180 CD

## **Thèse**

présenté par

**Jean-Pierre LESZCZAK**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR en Génie des Procédés**

**DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE ET DE  
L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE**

# **SYNTHESE D'ESTERS DE L'ACIDE BENZOÏQUE PAR CATALYSE ENZYMATIQUE EN MILIEU HETEROGENE MICROAQUEUX**

soutenue le 6 mars 1998

Président du Jury : Daniel THOMAS, Professeur, UTC Compiègne

Rapporteurs : Robert AZERAD, Directeur de Recherches CNRS, Paris V  
Didier COMBES, Professeur, INSA Toulouse

Membres du Jury : Robert PERRAUD, Professeur, UJF Grenoble  
Michel SOUSTELLE, Professeur, EMSE  
Canh TRAN-MINH, Maître de Recherches, EMSE



**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE  
DES MINES DE SAINT-ETIENNE**

**INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE GRENOBLE**

**n° d'ordre : 180 CD**

## **Thèse**

**présenté par**

**Jean-Pierre LESZCZAK**

**pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR en Génie des Procédés**

**DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE ET DE  
L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE**

## **SYNTHESE D'ESTERS DE L'ACIDE BENZOÏQUE PAR CATALYSE ENZYMATIQUE EN MILIEU HETEROGENE MICROAQUEUX**

**soutenue le 6 mars 1998**

**Président du Jury :** Daniel THOMAS, Professeur, UTC Compiègne

**Rapporteurs :** Robert AZERAD, Directeur de Recherches CNRS, Paris V  
Didier COMBES, Professeur, INSA Toulouse

**Membres du Jury :** Robert PERRAUD, Professeur, UJF Grenoble

Michel SOUSTELLE, Professeur, EMSE

Canh TRAN-MINH, Maître de Recherches, EMSE





***Success***

*is to be measured*

*not so much by*

*the position that one has reached in life*

*as by*

*the obstacles which he has overcome while trying to succeed*

B.I. WASHINGTON



Ce travail a été réalisé dans le centre Sciences des Processus Industriels et Naturels, au Laboratoire de Génie Enzymatique dirigé par Monsieur Canh TRAN-MINH, Directeur de Recherches de l'EMSE. Je le remercie de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir laissé une grande autonomie quant au déroulement de ce travail et d'avoir accepté d'être membre de mon jury.

Je tiens à remercier très sincèrement les autres membres de mon jury pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture de ce mémoire et pour les encouragements et les conseils qu'ils m'ont prodigués pour la suite de ma carrière.

Je suis très reconnaissant envers Monsieur le Professeur Daniel THOMAS, de l'UTC, qui a accepté cette invitation et a bien voulu présider ce jury.

Je tiens également à remercier Monsieur Robert AZERAD, Directeur de Recherches CNRS à Paris V, et Monsieur le Professeur Didier COMBES, Professeur à l'INSA de Toulouse, pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce mémoire et pour avoir porté un grand intérêt à mon travail.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur Robert PERRAUD de l'UJF de Grenoble et Monsieur le Professeur Michel SOUSTELLE de l'EMSE pour avoir jugé ce travail et participé au jury.

Je remercie du fond du cœur toutes les personnes qui ont croisé mon chemin en SPIN pendant cette thèse et qui, par leur gentillesse et leur aide, ont facilité mon intégration, et toutes celles qui ont assisté à ma soutenance.

Tout d'abord, j'exprime toute ma reconnaissance à Stéphane CHAPPAZ qui a démarré avec moi le thème "catalyse enzymatique en milieu organique", m'a appris les bases de l'enzymologie et surtout m'a permis une avancée plus rapide sur ce sujet en échangeant résultats et hypothèses au cours de nos nombreuses réunions de travail.

De même, je tiens à adresser mes remerciements aux permanents du troisième étage :

- à Marie-Claude BARTHOLIN, la mémoire de l'étage, pour avoir bien voulu partager son bureau avec moi, m'avoir supporté toutes ces années, prodigué de très bons conseils pour la soutenance et, malgré un emploi du temps chargé et des ennuis de santé, d'avoir toujours pris le temps de m'aider
- à Anne-Marie DANNA pour sa gentillesse, sa grande disponibilité et, surtout, pour sa correction très minutieuse de ce mémoire, qui, sans elle, serait truffé de fautes

- à Henri BESSET pour son aide précieuse et gratuite lors de problèmes techniques et surtout pour ses "ritonades" qui ont égayé les pauses-café.

Je ne veux pas oublier tous les thésards passés et à venir qui ont maintenu la bonne humeur à l'étage. Je souhaite bonne chance à mes prédécesseurs et amis Ivana, Laurence, Pascal A. et Hervé qui ont brillamment fini leur thèse. A Christine, ma collègue de promotion, Martine la biocaptrice, Jean-Jacques mon disciple de la CPG et partenaire de rugby, Bérangère l'accousmaticienne, Laurent l'internaute et les 4 nouveaux : Pascal B. le Basque de service, Jérôme le Nordiste, Vincent et Silvia mes successeurs, je leur souhaite beaucoup de courage, de patience et, surtout, tous mes vœux de réussite.

J'ai également une petite pensée pour toutes les autres personnes de l'Ecole, permanents ou non, qui m'ont aidé sans rien demander en retour, en particulier pour M. Igier au service Reprographie pour sa gentillesse et son aide rapide.

Je n'oublie pas pour autant d'autres personnes avec qui j'ai fait un bout de chemin : je pense à Fiona, Agnès et Cyrille, et tous les élèves-chercheurs, stagiaires et élèves de l'Ecole.

Enfin je terminerai par les personnes les plus chères pour moi, ma femme Ewa et toute ma famille pour n'avoir jamais cessé de m'encourager pendant ces longues années d'études, pour avoir supporté ma mauvaise humeur des jours précédant la soutenance et pour m'avoir déchargé d'un poids qui est la préparation du pot de thèse en travaillant dans l'ombre. Je les remercierai toute ma vie pour cela. Merci à ma grand-mère pour être venue de Pologne afin d'assister à la soutenance de ce travail.

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE A : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>3</b>
<b>A.1. LIPASES EN MILIEU AQUEUX.....</b>	<b>3</b>
A.1.1. GENERALITES SUR LES ENZYMES .....	3
A.1.2. HYDROLASES.....	4
A.1.3. TRIACYLGLYCEROL HYDROLASES .....	4
A.1.3.1. Généralités.....	4
A.1.3.2. Mécanisme réactionnel .....	5
A.1.3.3. pH et température.....	6
A.1.3.4. Spécificité et sélectivité.....	7
A.1.3.4.1. Spécificité vis-à-vis d'un substrat.....	7
A.1.3.4.2. Régiosélectivité .....	7
A.1.3.4.3. Stéréosélectivité.....	8
<b>A.2. LIMITES DES REACTIONS EN MILIEU AQUEUX .....</b>	<b>8</b>
<b>A.3. APPORTS DES MILIEUX ORGANIQUES .....</b>	<b>9</b>
A.3.1. HISTORIQUE .....	9
A.3.2. AVANTAGES DES MILIEUX ORGANIQUES .....	10
<b>A.4. SYSTEMES ENZYMATIQUES METTANT EN JEU UN SOLVANT ORGANIQUE .....</b>	<b>11</b>
A.4.1. MILIEUX MACROHETEROGENES.....	11
A.4.1.1. Systèmes biphasiques liquide-liquide .....	11
A.4.1.2. Milieux biphasiques solide-liquide.....	12
A.4.1.2.1. Enzymes solides en suspension dans un milieu organique.....	13
A.4.1.2.2. Enzymes immobilisées.....	14
A.4.1.2.3. Solvants utilisés .....	16
A.4.1.3. Milieux biphasiques solide-gaz.....	16
A.4.2. MILIEUX MICROHETEROGENES .....	17
A.4.2.1. Enzymes modifiées de façon covalente.....	17
A.4.2.2. Complexes non-covalents.....	18
A.4.2.3. Micelles inverses.....	19
A.4.3. CONCLUSION .....	20
<b>A.5. ROLE DE L'EAU DANS LES REACTIONS EN MILIEUX ORGANIQUES MICROAQUEUX.....</b>	<b>21</b>
A.5.1. QUANTITE D'EAU .....	21
A.5.2. LOCALISATION DE L'EAU DANS LE SYSTEME.....	22
A.5.3. ROLE DE L'EAU AU NIVEAU MOLECULAIRE.....	23
A.5.4. RELATION ACTIVITE ENZYMATIQUE-ACTIVITE EN EAU.....	24
A.5.5. NOUVELLES PROPRIETES DES ENZYMES EN MILIEUX PAUVRES EN EAU .....	25
A.5.5.1. Rigidification de la structure de la molécule d'enzyme .....	25
A.5.5.1.1. Mémoire pH.....	25
A.5.5.1.2. Empreinte moléculaire.....	26
A.5.5.1.3. Altération de la sélectivité.....	27
A.5.5.2. Thermorésistance .....	27



<b>A.6. ROLE DU SOLVANT ORGANIQUE.....</b>	<b>28</b>
A.6.1. NATURE DU SOLVANT.....	28
A.6.2. INFLUENCE DU SOLVANT SUR LE BIOCATALYSEUR HYDRATE .....	29
A.6.3. INFLUENCE DU SOLVANT SUR LA REACTION.....	30
A.6.4. NOUVELLES PROPRIETES CATALYTIQUES ASSOCIEES A LA PRESENCE D'UN SOLVANT ORGANIQUE .....	31
<b>A.7. LIPASES EN MILIEUX ORGANIQUES.....</b>	<b>33</b>
A.7.1. REACTIONS CATALYSEES PAR LES LIPASES EN MILIEUX ORGANIQUES .....	33
A.7.2. MECANISME REACTIONNEL D'ESTERIFICATION PAR CATALYSE ENZYMATIQUE.....	34
A.7.3. APPLICATIONS DES LIPASES EN MILIEU ORGANIQUE .....	35
A.7.3.1. Synthèse de polyesters .....	36
A.7.3.2. Modification de glycérides.....	36
A.7.3.3. Acylation régiosélective de glycosides .....	36
A.7.3.4. Synthèse d'esters présents dans les arômes .....	36
A.7.3.5. Esters difficiles à synthétiser par voie enzymatique.....	38
A.7.3.6. Esters de l'acide benzoïque .....	38
 <b>CHAPITRE B : MATERIELS ET METHODES .....</b>	 <b>41</b>
<b>B.1. MATERIELS.....</b>	<b>41</b>
B.1.1. ENZYMES .....	41
B.1.2. PRODUITS.....	41
<b>B.2. CONDITIONS DE REACTION.....</b>	<b>42</b>
<b>B.3. METHODES ANALYTIQUES .....</b>	<b>42</b>
B.3.1. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE .....	42
B.3.2. DOSAGE DE L'EAU PAR LA METHODE DE KARL-FISCHER.....	43
<b>B.4. DETERMINATION DE L'HUMIDITE DE LA POUDRE ENZYMATIQUE.....</b>	<b>43</b>
<b>B.5. DOSAGE DES PROTEINES.....</b>	<b>43</b>
<b>B.6. DEFINITIONS.....</b>	<b>44</b>
B.6.1. ENZYME LYOPHILISEE .....	44
B.6.2. ENZYME SECHEE.....	44
B.6.3. ENZYME PURIFIEE .....	44
B.6.4. ENZYME INCUBEE EN PRESENCE DE TOLUENE.....	44
<b>B.7. REUTILISATION DE L'ENZYME.....</b>	<b>44</b>
<b>B.8. PHASE D'INCUBATION.....</b>	<b>45</b>
<b>B.9. DETERMINATION DES COEFFICIENTS DE PARTAGE .....</b>	<b>45</b>
<b>B.10. SYNTHESE CHIMIQUE DU BENZOATE DE 2-BUTYLE .....</b>	<b>45</b>

<b>B.11. PRE-EQUILIBRAGE A UNE ACTIVITE EN EAU DONNEE.....</b>	<b>46</b>
B.11.1. ENZYME.....	46
B.11.2. SOLVANTS PRE-EQUILIBRES.....	46
<b>B.12. METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES .....</b>	<b>46</b>
B.12.1. PLAN FACTORIEL COMPLET .....	47
B.12.2. PLANS FACTORIELS FRACTIONNAIRES .....	48
<b>B.13. METHODES MATHEMATIQUES.....</b>	<b>49</b>
B.13.1. LOGICIEL NEMROD® POUR LES PLANS D'EXPERIENCES.....	49
B.13.2. CALCUL DES PARAMETRES CINETIQUES.....	50
 <b>CHAPITRE C : LE BENZOATE DE METHYLE .....</b>	 <b>51</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>51</b>
<b>C.1. MISE EN PLACE DU SYSTEME CATALYTIQUE.....</b>	<b>51</b>
C.1.1. MILIEU DE REACTION .....	51
C.1.2. CRIBLAGE ENZYMATIQUE.....	52
C.1.3. NOTATIONS EMPLOYEES.....	52
<b>C.2. UTILISATION DE L'ESTERASE 30 000 (MME).....</b>	<b>53</b>
C.2.1. ESSAIS EN SOLVANTS SECHES SUR TAMIS MOLECULAIRE 3 Å .....	53
C.2.2. ESSAIS AVEC LE TOLUENE SATURE EN EAU.....	55
C.2.3. CONCLUSION .....	57
<b>C.3. UTILISATION DE LA LIPASE DE <i>Candida rugosa</i> (CRL).....</b>	<b>58</b>
C.3.1. CRL UTILISEE DIRECTEMENT AVEC DES SOLVANTS SATURES EN EAU .....	58
C.3.1.1. Comparaison toluène sec - toluène saturé en eau.....	58
C.3.1.2. Estimation de l'influence de quelques facteurs sur la réaction d'estérification..	59
C.3.1.3. Influence de la proportion des solvants dans le milieu organique.....	60
C.3.1.4. Influence de la concentration en méthanol .....	61
C.3.1.5. Influence de la concentration en acide benzoïque .....	63
C.3.1.6. Conclusion.....	64
C.3.2. CRL PREALABLEMENT INCUBEE DANS DU TOLUENE SATURE EN EAU.....	64
C.3.2.1. Effet de l'incubation .....	64
C.3.2.2. Effet de la concentration en méthanol.....	65
C.3.2.3. Influence de la quantité de CRL.....	67
C.3.2.4. Conclusion.....	68
C.3.3. INFLUENCE DE L'EAU DANS LE MILIEU REACTIONNEL.....	68
C.3.3.1. Effet de l'addition d'un volume d'eau.....	68
C.3.3.2. Approche par les plans d'expériences.....	74
C.3.3.2.1. Plan factoriel fractionnaire 2 <sup>5-2</sup> .....	74
C.3.3.2.2. Plan factoriel complet 2 <sup>4</sup> .....	78
C.3.3.3. Influence de la concentration en acide benzoïque en présence d'eau.....	83
C.3.3.4. Influence de la concentration en méthanol en présence d'eau.....	84
C.3.3.5. Influence de la fraction volumique de toluène pour différents ajouts d'eau.....	85

C.3.3.6. Influence de paramètres physiques en présence d'eau.....	89
C.3.3.6.1. La température .....	89
C.3.3.6.2. La vitesse d'agitation.....	90
C.3.3.7. Influence des concentrations en substrats.....	91
C.3.3.8. Influence de la teneur en CRL.....	93
C.3.3.9. Influence de la pré-incubation sur la stabilité de la CRL .....	94
C.3.3.10. Influence du conditionnement de la poudre catalytique .....	95
C.3.4. INTRODUCTION D'EAU PAR PRE-EQUILIBRAGE A ACTIVITE EN EAU DONNEE .....	99
C.3.4.1. Influence de la concentration en MeOH sur la CRL pré-équilibrée à différentes activités en eau.....	100
C.3.4.2. Influence de la teneur en CRL pré-équilibrée à $a_w$ 0,65 .....	102
C.3.4.3. Influence des conditions de lyophilisation sur la CRL pré-équilibrée à $a_w$ 0,65 .....	104
C.3.4.4. Répétabilité de la réaction .....	107
C.3.4.5. Influence de la proportion de toluène dans le mélange hexane/toluène saturé en eau .....	107
C.3.4.6. Influence du rapport molaire BzOH/MeOH.....	109
C.3.4.6.1. Influence du rapport molaire BzOH/MeOH sur la vitesse initiale spécifique .....	109
C.3.4.6.2. Influence du rapport molaire BzOH/MeOH sur les taux de conversion et la quantité de BzOMe produite.....	111
C.3.4.6.3. Conclusion.....	115
C.4. CONCLUSION DU CHAPITRE C.....	116

## CHAPITRE D : LES BENZOATES DE BUTYLE..... 119

### INTRODUCTION DU CHAPITRE D ..... 119

#### D.1. LE BENZOATE DE 1-BUTYLE ..... 120

##### D.1.1. EFFET DE LA CONCENTRATION EN 1-BUTANOL SUR LA LIPASE NON PRE-EQUILIBREE..... 120

D.1.1.1. Sans addition d'eau..... 120

D.1.1.2. Avec une addition d'eau de 500 mg/l..... 122

##### D.1.2. EFFET DE LA CONCENTRATION EN 1-BUTANOL SUR LA LIPASE PRE-EQUILIBREE A $A_w$ 0,65.. 125

D.1.2.1. Influence de l'hydratation du 1-butanol .....

D.1.2.2. Système 1-butanol pré-équilibré et solvants saturés en eau..... 127

D.1.2.3. Système 1-butanol et solvants pré-équilibrés à  $a_w$  0,65 .....

##### D.1.3. MODELISATION DE LA CINETIQUE DE REACTION ..... 130

##### D.1.4. INFLUENCE DE LA FRACTION DE TOLUENE DANS LE MILIEU ORGANIQUE SUR LA REACTION ... 140

##### D.1.5. INFLUENCE DE LA TENEUR EN CRL SUR LA REACTION ..... 142

##### D.1.6. REUTILISATION DE LA CRL ..... 148

#### D.2. LES BENZOATES DE 2-BUTYLE..... 149

##### D.2.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN 2-BUTANOL RACEMIQUE ..... 149

D.2.1.1. Influence de la position de la fonction hydroxyle..... 149

D.2.1.2. Influence de la concentration en 2-butanol racémique..... 150

##### D.2.2. INFLUENCE DE LA FRACTION DE TOLUENE DANS LE MILIEU ORGANIQUE SUR LA CINETIQUE DE REACTION..... 152

##### D.2.3. ENANTIOSELECTIVITE DE LA POUDRE ENZYMATIQUE ..... 153

D.2.3.1. Réactivité des isomères du 2-butanol..... 153

D.2.3.2. Influence de la fraction de toluène dans le milieu organique..... 154

D.2.3.3. Influence de la concentration en énantiomères sur la  $V_i(sp)$ ..... 155

<b>D.3. CONCLUSION DU CHAPITRE D.....</b>	<b>156</b>
<b>CHAPITRE E : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>159</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>163</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>171</b>



**$a_w$**  : activité en eau de la solution saturée en sels à partir de laquelle l'enzyme ou les autres composants du système sont pré-équilibrés.

**BuOH ou 1-BuOH** : 1-butanol

**2-BuOH** : 2-butanol

**BzOH** : acide benzoïque

**BzOMe** : benzoate de méthyle

**CRL** : poudre enzymatique commerciale de lipase de *Candida rugosa*

**ee** : excès énantiomérique

**EtOH** : éthanol

**$K_i$**  : constante d'inhibition du 1-BuOH (mM)

**$K_M(\text{BuOH})$**  : constante d'affinité du butanol pour l'enzyme (mM)

**$K_M(\text{BzOH})$**  : constante d'affinité de l'acide benzoïque pour l'enzyme (mM)

**$\log(P)$**  : logarithme du coefficient de partage d'un solvant dans un système octanol/eau caractérisant son hydrophobie

**MeOH** : méthanol

**MME** : poudre enzymatique commerciale d'estérase 30 000 de *Mucor miehei*

**PrOH** : n-propanol

**$P_{\text{BzOH}}^{\text{hex/tol}}$**  : coefficient de partage de BzOH entre le milieu hexane/toluène et l'eau pure

**$V_i$**  : vitesse initiale ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )

**$V_i(\text{sp})$**  : vitesse initiale spécifique ( $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ )

**$V_m$  ou  $V_m(\text{sp})$**  : vitesse maximale de la réaction ( $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ )

**$V_{\text{max}}(\text{sp})$**  : vitesse maximale spécifique au cours de la réaction ( $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ )

**$y(\text{BuOH})$**  : facteur correcteur sur la concentration en BzOH en phase organique





# **INTRODUCTION GENERALE**



La catalyse enzymatique en milieux hétérogènes microaqueux, initiée par l'équipe de Klibanov, est étudiée depuis le milieu des années 80. Elle consiste à mettre une poudre enzymatique, catalyseur biologique, en suspension dans un milieu organique pauvre en eau contenant les substrats à transformer. C'est actuellement la technique de choix pour de nombreuses réactions impossibles à réaliser en milieux aqueux. En particulier, les estérifications enzymatiques se sont rapidement révélées comme de bons modèles d'études, car, en milieu aqueux, l'équilibre de la réaction est déplacé dans le sens hydrolyse. Par ailleurs, les problèmes de régénération du catalyseur sont éliminés car les enzymes utilisées, les triacyl glycérol hydrolases, fonctionnent sans cofacteur. L'engouement pour les milieux microaqueux a permis d'augmenter les connaissances sur les enzymes et leur fonctionnement. Cependant, les travaux se limitent souvent aux esters d'acides carboxyliques aliphatiques linéaires à des fins agroalimentaires. En effet, la synthèse d'esters d'acides carboxyliques  $\alpha$ -ramifiés, et plus particulièrement de l'acide benzoïque, a été peu étudiée. Pourtant, elle permettrait d'apporter des informations supplémentaires sur le fonctionnement des enzymes en milieux microaqueux, de confirmer certaines conclusions obtenues avec les acides aliphatiques et d'avoir une vision plus générale de ces systèmes hétérogènes. D'un point de vue applications, les benzoates sont des esters minoritairement présents dans la composition de nombreux arômes de fruits.

Employer des milieux hétérogènes signifie souvent augmenter le degré de difficulté, car des phénomènes supplémentaires, liés aux limitations diffusionnelles et à la répartition des différents composants du système entre les différentes phases en présence, s'ajoutent à la biocatalyse elle-même. Ainsi, la forme du biocatalyseur et la nature du milieu organique sont importantes : la première dicte l'accessibilité des substrats aux sites actifs, la seconde la cinétique et la position de l'équilibre de la réaction.

Cette étude, en prenant comme modèles certains benzoates, soulignera l'influence de nombreux facteurs sur la cinétique d'estérification, et surtout mettre en avant la présence d'interactions entre facteurs.

Le chapitre A est un résumé des connaissances actuelles dans le domaine de la catalyse enzymatique en milieu organique. Cette étude bibliographique insiste plus particulièrement sur les systèmes enzymatiques microaqueux employant des lipases.

Le chapitre B regroupe les méthodes et techniques nécessaires à la bonne compréhension de ce travail et des résultats présentés.

## *Introduction*

Les résultats et discussions sont séparés en deux chapitres. Dans le chapitre C, la catalyse enzymatique en milieu organique microaqueux permettra la synthèse du benzoate de méthyle car, d'une part, c'est un des esters de l'acide benzoïque les plus abondants dans les arômes, et, d'autre part, les esters méthyliques sont des esters très difficiles à obtenir. Dans un premier temps, des conditions de réaction seront déterminées et optimisées pour obtenir cet ester avec des taux de conversion élevés. Puis, l'influence de différents facteurs sur la réaction sera étudiée en fonction de la teneur en eau dans le système. Dans le chapitre D, ce système sera appliqué à la synthèse de benzoates de butyle. Ceci permettra de confronter les résultats avec le méthanol et les isomères du butanol, d'apporter des informations complémentaires sur notre système, et enfin d'aborder le caractère énantiosélectif de la lipase employée pour la synthèse du benzoate de 2-butyle.

Enfin, le chapitre E regroupe les conclusions et perspectives de ce travail.

**CHAPITRE A**  
**RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**





## A.1. LIPASES EN MILIEU AQUEUX

### A.1.1. Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont des protéines : elles sont le résultat de polymérisations ordonnées d'acides aminés, formant ainsi des chaînes polypeptidiques.

Leur rôle est de catalyser et réguler *in vivo* les réactions nécessaires à tout organisme vivant. Chaque enzyme intervient dans une réaction précise sur un ou une famille de substrats, généralement de façon régio et stéréosélective.

Comme tout catalyseur, les enzymes interviennent dans les réactions sans être consommées. Elles abaissent les énergies d'activation, et donc augmentent les cinétiques de réactions par des facteurs bien supérieurs à  $10^6$  sans modifier la position de l'équilibre thermodynamique.

Le fort potentiel de ces biocatalyseurs intéresse les industries chimiques et biochimiques. La production d'enzymes s'est élevée à 75 000 T en 1985 (Kilara 1985). Ces enzymes proviennent essentiellement de microorganismes : bactéries, levures et champignons, mais également de mammifères.

Leur nom officiel est composé du nom du substrat ou, la plupart du temps, du type de réaction avec le suffixe "ase". Dans un souci de cohésion, l'International Union of Biochemistry a classé les enzymes en fonction du type de réactions catalysées. Une enzyme est ainsi désignée par E.C. (Enzyme Commission) puis par une série de chiffres dont le premier représente la classe d'enzyme (Tableau A.1.1), le second le type de réaction, le troisième la nature du substrat et le quatrième le numéro individuel de l'enzyme.

Classe d'enzyme	Nom
1	Oxydoréductases
2	Transférases
3	Hydrolases
4	Lyases
5	Isomérases
6	Ligases

**Tableau A.1.1** : Nom des différentes classes d'enzymes.

Bien que la taille des enzymes soit très variable, c'est surtout leur structure tridimensionnelle qui leur confère leur sélectivité et leur spécificité. En effet, leur structure est classée en 4 niveaux. La structure primaire est la séquence linéaire d'acides aminés de la chaîne polypeptidique. Les enzymes se différencient par la longueur de la chaîne d'acides aminés et par l'agencement différent de ceux-ci. La structure secondaire résulte de la

possibilité de formation de liaisons hydrogène entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène de l'azote amidé de la liaison peptidique : des structures ordonnées apparaissent : hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ . La macromolécule se replie sur elle-même pour former un amas compact de structure spatiale bien déterminée : c'est la structure tertiaire. Ce repliement est principalement dû aux chaînes latérales, où se créent des liaisons covalentes comme les ponts disulfure, et un grand nombre d'interactions de faibles énergies : liaisons hydrogène, interactions hydrophobes et électrostatiques. Certaines enzymes peuvent également être formées par association de plusieurs sous-unités ou protomères. Cette association constitue la structure quaternaire.

Dans cet amas sphérique, d'où le nom de protéines globulaires, il existe une ou plusieurs régions participant à la catalyse. Ces régions, appelées sites actifs, regroupent des acides aminés, centre de la réaction.

Par ailleurs, certaines enzymes nécessitent la présence d'un cofacteur. Le cofacteur est, soit un ion métallique, soit un coenzyme, molécule organique complexe telle le NAD, CoA, ATP,... Il permet de régénérer le biocatalyseur après un cycle catalytique.

### **A.1.2. Hydrolases**

Parmi toutes les familles d'enzymes, les hydrolases (E.C.3) sont les plus étudiées et les plus utilisées. Elles représentent 80% de la production mondiale d'enzymes (Kilara 1985). Il faut tout de même différencier les différentes sous-classes : 60% des enzymes produites sont des protéases (E.C.3.4), 30% des glycosidases (E.C.3.2), 3% des triacylglycérol hydrolases (E.C.3.1.1.3) et toutes les autres hydrolases représentent seulement 7%.

Comme leur nom l'indique, elles interviennent *in vivo* dans toutes les réactions d'hydrolyse.

### **A.1.3. Triacylglycérol hydrolases**

#### **A.1.3.1. Généralités**

Les triacylglycérol hydrolases, plus communément appelées lipases, sont une sous-classe des hydrolases et sont regroupées dans la classification sous le numéro E.C. 3.1.1.3.

Leur rôle biologique est l'hydrolyse des tri-, di- et monoglycérides. Ces esters sont les réserves énergétiques des organismes supérieurs. Les lipases interviennent donc au stade de l'assimilation des graisses au sein de l'organisme, en participant à l'équilibre stockage de

graisse-libération d'acides gras. *In vitro*, certaines lipases peuvent hydrolyser des esters carboxyliques non-naturels.

Les sources de lipases sont très variées, et plusieurs lipases sont commercialisées. Elles sont obtenues à partir de microorganismes ou de mammifères.

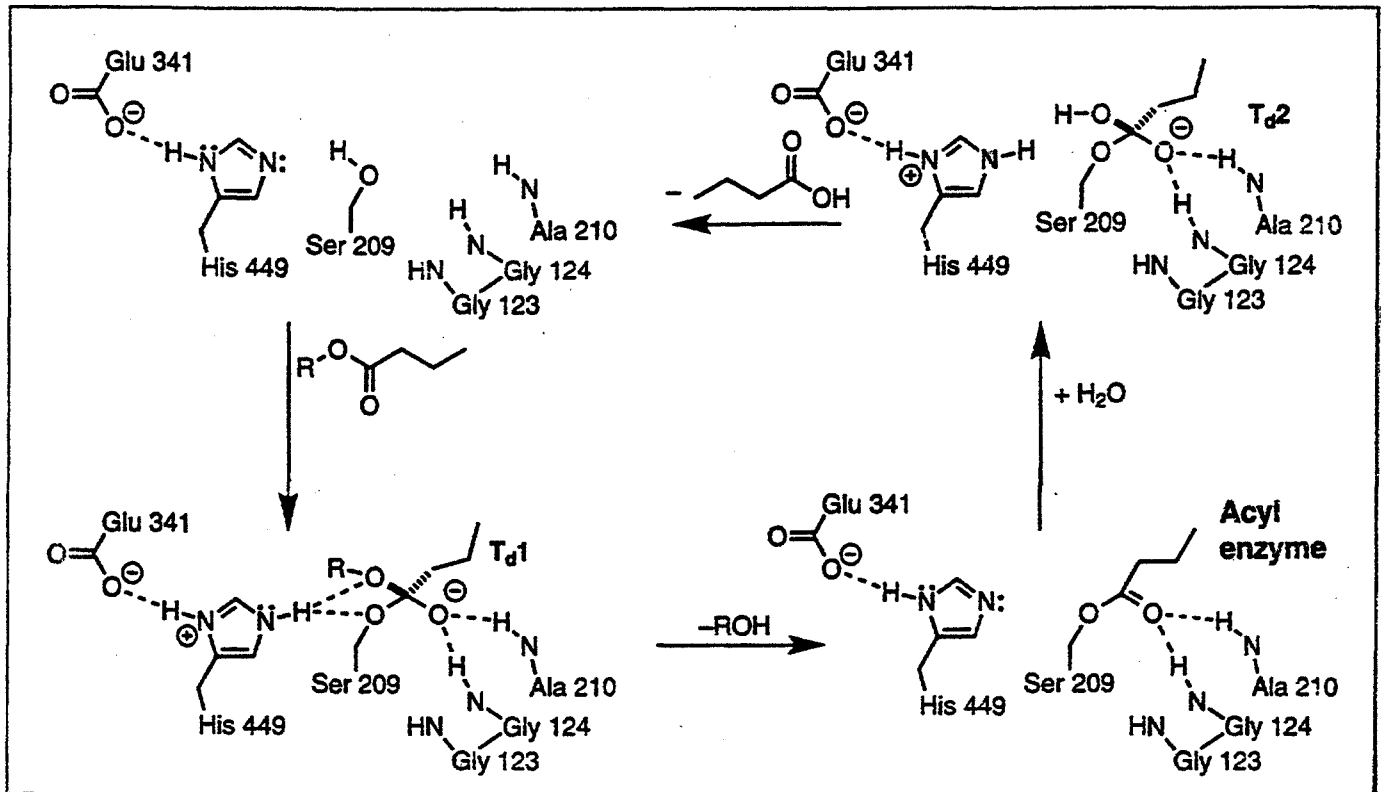
La masse moléculaire des lipases est très variable. Par exemple, la lipase de *Penicillium cyclopium* a une masse de 27 kDa (Iwai 1975) alors que celle de la lipase pancréatique humaine est de 500 kDa (Verger 1984). Malgré cette différence de masse, la diffraction aux rayons X de plusieurs lipases présente des homologies de structures. Tout d'abord, il semble que le repliement des lipases se fait sur le même mode : un cœur de feuillets  $\beta$  quasi parallèles entouré d'hélices  $\alpha$  (Ollis 1992). De plus, un enchaînement d'acides aminés similaire à toutes les lipases et estérases a été mis en évidence par séquençage. Il s'agit de l'enchaînement Gly-X-Ser-Y-Gly, avec X : His ou Tyr, Y : acide aminé variable (Brady 1990). Le résidu sérinique, et plus précisément l'hydroxyle de la sérine, est le centre du site actif. Il se situe à l'extrémité de la boucle d'une "épingle à cheveux" entre une hélice  $\alpha$  et un feuillet  $\beta$ . Deux autres acides aminés font partie du site actif : ce sont l'histidine (His) et l'acide aspartique (Asp) ou l'acide glutamique (Glu). Ces trois acides aminés, machinerie catalytique, sont souvent regroupés sous le terme triade catalytique. D'autres acides aminés, dont certains appartenant à d'autres boucles du polypeptide, agissent sur la stabilisation des intermédiaires de réaction en se plaçant à l'opposé de l'His par rapport à la Ser.

#### A.1.3.2. Mécanisme réactionnel

Le mécanisme réactionnel de l'hydrolyse est connu (Kazlauskas 1994). D'un point de vue microscopique, l'hydroxyle activé de la sérine (Ser) s'associe et réagit avec l'ester (Figure A.1.3.2.a). Cette activation est réalisée par un déplacement de charge de l'hydroxyle de la Ser vers le carboxyle de l'Asp ou du Glu via le cycle imidazole de l'His (Boland 1991). Un intermédiaire tétraédrique stabilisé par les résidus d'autres acides aminés et de structure spatiale définie est formé dans la cavité oxyanion. Après départ de l'alcool, l'intermédiaire acyl-enzyme est formé. Avec l'arrivée du nucléophile eau, l'imidazole de l'His à nouveau déprotone l'eau avec un relargage concomitant d'un proton au niveau de l'Asp. L'ion hydroxyle alors attaque l'acylsérine et forme un deuxième intermédiaire tétraédrique. Celui-ci alors se réarrange, libère l'acide carboxylique et régénère la sérine. Le cycle catalytique peut ainsi recommencer. Ce mécanisme est très proche des sérine-protéases.

Contrairement aux estérases, la triade catalytique des lipases est recouverte par une ou plusieurs boucles qui protègent le site actif des agressions du milieu extérieur. Ces boucles,

appelées couvercles, doivent basculer pour permettre l'accès du substrat au site catalytique. Ce réarrangement de la chaîne principale a lieu à l'interface phase aqueuse-phase lipidique. Il s'accompagne du positionnement favorable d'un résidu d'acide aminé stabilisant les intermédiaires de réaction. Ce phénomène est appelé activation interfaciale. Ceci explique pourquoi les lipases hydrolysent des substrats insolubles dans l'eau, alors que les estérases en sont incapables.



**Figure A.1.3.2.a :** Cycle catalytique de l'hydrolyse du butyrate d'alkyle par la lipase de *Candida rugosa* (tirée de Kazlauskas 1994).

### A.1.3.3. pH et température

En milieu aqueux, les facteurs pH et température influencent l'activité hydrolytique et la stabilité des lipases. Le pH du milieu aqueux affecte la lipase, et les enzymes en général, en modifiant l'équilibre délicat des forces et interactions maintenant sa structure tridimensionnelle. Ainsi, le pH optimal des lipases est souvent neutre, avec certaines différences propres à l'organisme dont elles sont issues. Le pH de travail est pour les lipases d'origine bactérienne compris entre 5,6 et 8,5 (Sugiura 1975) et pour les lipases d'origine fongique entre 4 et 10, avec tout de même des pH optimaux pour toutes les lipases souvent autour de 8 (Moskowitz 1977).

La température, bien que favorable à la réaction, est également un élément limitant, car presque toutes les enzymes *in vivo* fonctionnent à des températures ne dépassant pas 40°C. Au-delà de cette limite, l'activité enzymatique diminue très rapidement.

En effet, en dehors de ces gammes de pH et surtout à des températures plus élevées, la lipase est généralement dénaturée, car alors l'hydrolyse chimique de certaines fonctions de chaînes latérales, voire de liaisons peptidiques fragiles, est grandement favorisée. Les lipases microbiennes extracellulaires sont toutefois beaucoup plus stables que les lipases animales (Yamane 1987).

#### A.1.3.4. Spécificité et sélectivité

La grande spécificité et sélectivité des enzymes, et donc des lipases, est sans doute le point le plus attractif de ces catalyseurs. Elles sont la conséquence d'une structure tridimensionnelle et d'un site actif bien définis. Ceux-ci dépendent du repliement du biocatalyseur, offrant ainsi des cavités plus ou moins grandes et polaires, et par la même, un accès limité aux substrats de tailles comparables ou plus petits. Il existe plusieurs points de fixation en dehors du carboxyle de l'ester et l'hydroxyle de la Ser, entre les substituants des chaînes carbonées de l'ester correspondant et les résidus à l'intérieur des cavités. Ceci a pour conséquence d'apporter une spécificité vis-à-vis du substrat, une régio- et une stéréosélectivité très intéressantes.

##### A.1.3.4.1. Spécificité vis-à-vis d'un substrat

La longueur de la chaîne carbonée de l'acyle est sans doute déterminante. La lipase de *Mucor miehei* a une activité hydrolytique maximale pour des acyles comprenant 4 à 6 carbones (Moskowitz 1977), alors que l'activité maximale de la lipase de *Geotrichum candidum* se manifeste pour des molécules comprenant 8 à 10 carbones (Iwai 1980).

##### A.1.3.4.2. Régiosélectivité

L'hydrolyse d'esters primaires est généralement favorisée. Pour les esters du glycérol, la lipase de *Mucor miehei* (Tsujioka 1977) ou la lipase pancréatique de porc (Desnuelle 1961) sont ainsi spécifiques des positions 1 et 3 (Malcata 1992). L'hydrolyse de l'ester en position 2 est rare, mais possible avec la lipase de *Geotrichum candidum*, si les acides linoléique ou oléique sont obtenus (Jensen 1987).

Les lipases en milieu aqueux sont donc des catalyseurs de déprotection régiosélectifs.



#### A.1.3.4.3. Stéréosélectivité

Les lipases permettent la résolution d'alcools ou d'acides énantiomères à partir d'esters naturels et non-naturels par hydrolyse stéréosélective.

Par exemple, l'hydrolyse énantiosélective de l'ester de kétoprofène racémique par la lipase de *Candida rugosa* donne l'énantiomère (S) de cet anti-inflammatoire avec un rapport énantiomérique supérieur à 100, c'est-à-dire que son hydrolyse est 100 fois à celle de l'isomère (R) (Wu 1990).

Cette résolution par catalyse enzymatique permet ainsi d'obtenir l'énantiomère désiré. Il est cependant nécessaire de faire un criblage enzymatique, car il ne faut pas oublier que chaque enzyme a un site spécifique à une gamme de tailles plus ou moins étroite.

### A.2. LIMITES DES REACTIONS EN MILIEU AQUEUX

Travailler en milieu aqueux limite grandement le développement des réactions par voie enzymatique. En premier lieu, lorsque l'eau intervient dans la réaction, l'équilibre sera déplacé en faveur de l'hydrolyse. Ceci peut être intéressant pour des déprotections sélectives ou des résolutions d'esters. Toutefois, la réaction inverse est souvent plus attractive, surtout si le produit recherché est le produit inverse à l'hydrolyse (esters, amides) à partir de l'acide. Plutôt que passer par une estérification chimique non sélective suivie d'une hydrolyse enzymatique (actuellement c'est la méthode utilisée dans la plupart des cas), l'estérification directe de l'acide par voie enzymatique éliminerait une ou plusieurs étapes et donc diminuerait les coûts importants de ces résolutions.

L'eau intervient également parfois dans des réactions parasites par sa réaction avec les substrats ou les produits sensibles à l'humidité. L'eau engendre l'hydrolyse spontanée ou la racémisation de composés fragiles.

Par ailleurs, la solubilité des substrats organiques principalement hydrophobes est un facteur limitant, car il faut que le substrat atteigne le site actif pour qu'il ait réaction. Le manque de solubilité de ces substrats en milieu aqueux est donc un frein : réactions lentes, voire impossibles.

D'un point de vue pratique et économique, la récupération et la purification des produits et de l'enzyme sont souvent plus délicates et donc plus coûteuses à partir d'un milieu aqueux. Certains préconisent l'immobilisation covalente des enzymes sur des supports insolubles, mais le coût de cette étape et la perte d'activité enzymatique engendrée sont limitants à grande échelle.

Enfin, les enzymes ne sont pas très stables en milieu aqueux, et sont très sensibles à la température. Au-delà de 40°C, elles sont rapidement dénaturées.

### **A.3. APPORTS DES MILIEUX ORGANIQUES**

#### **A.3.1. Historique**

L'introduction de solvants organiques miscibles dans les milieux aqueux a eu d'abord pour but d'augmenter la solubilité de composés hydrophobes. Le passage de milieux aqueux à des milieux essentiellement organiques a été long et a nécessité plusieurs étapes. Klivanov est souvent considéré comme le véritable précurseur de l'enzymologie non-aqueuse.

D'un point de vue historique, ce sont deux français Bourquelot et Bridel qui ont mis en évidence en 1913 la possibilité d'ajouter des solvants organiques pour solubiliser les substrats et obtenir ainsi une quantité plus importante de produits. En effet, ils obtinrent ainsi des alkylglucosides avec des rendements de 85% dans des solutions alcooliques contenant jusqu'à 95% (v/v) d'alcool. L'émulsine extraite de l'amande et insoluble dans ces milieux alcooliques a été utilisée comme catalyseur (Bourquelot 1913).

Cependant leurs résultats restèrent dans l'ombre. C'est seulement vers le milieu des années 60 que Iwai (1964) décrivit la première synthèse de glycérides dans un système biphasique. Dastoli, d'autre part, mit en évidence la production de glucosides avec l' $\alpha$ -chymotrypsine en suspension dans du dichlorométhane (Dastoli 1966), puis l'oxydation du crotonaldéhyde par la xanthine oxydase du lait dans de nombreux solvants organiques (Dastoli 1967).

Cette deuxième vague d'expériences en milieu organique, malgré des résultats innovants, restera au stade de la curiosité et ne suscitera pas de vraies recherches dans ce domaine. Il faut attendre encore une quinzaine d'années, car ce n'est qu'à partir des années 80 que la catalyse enzymatique en milieu organique sera étudiée. Klivanov donne alors un début d'explication du phénomène en se posant les bonnes questions sur le fonctionnement d'une enzyme, et généralise certains concepts valables encore aujourd'hui. Il met surtout en avant l'apparition de nouvelles propriétés des enzymes dans les milieux essentiellement organiques. Ceci provoquera un nouvel élan dans le domaine de la catalyse enzymatique à des fins pharmaceutiques et agroalimentaires.

### **A.3.2. Avantages des milieux organiques**

Les nombreuses recherches développées par la suite vont confirmer la nette supériorité des milieux organiques, car ces derniers permettent de contourner certaines limites imposées par les milieux aqueux et d'élargir les possibilités de ces biocatalyseurs (Halling 1987, Laane 1987, Arnold 1990, Dordick 1992). Les différents avantages des réactions enzymatiques en milieu organique sont résumés ci-après. Certains seront détaillés par la suite.

- Augmentation de la solubilité des substrats peu polaires ou apolaires
- Récupération facilitée du produit présent dans un solvant organique facilement évaporable
- Récupération facilitée de l'enzyme par simple filtration ou centrifugation
- Immobilisation non nécessaire car les enzymes sont généralement insolubles dans les solvants organiques
- Immobilisation possible et facile par simple adsorption sur le support, car les enzymes sont insolubles dans ces milieux
- Suppression des réactions parasites avec l'eau : l'hydrolyse de groupes sensibles à l'eau
- Déplacement des équilibres thermodynamiques dépendant de la teneur en eau en faveur de la synthèse et non de l'hydrolyse : synthèse d'esters et d'amides
- Possibilité de travailler avec d'autres nucléophiles différents de l'eau : alcools, amines et esters pour des réactions d'estérification, amidation ou transestérification
- Thermostabilité supérieure de l'enzyme
- Changement de la sélectivité et de la spécificité de l'enzyme
- Intégration plus facile de l'étape enzymatique dans une synthèse chimique multi-étapes
- Contamination bactérienne impossible

Tous ces points sont valables uniquement pour les systèmes où l'enzyme solide est en suspension dans un milieu organique. En particulier, certains systèmes employés (cf paragraphe A.4) n'ont pas tous ces avantages. Cette longue énumération montre bien que la catalyse enzymatique en milieu organique est très attractive. Entre autres, l'emploi de milieu organique a permis de mieux comprendre les mécanismes réactionnels au niveau moléculaire, et plus particulièrement le rôle primordial du milieu dans lequel la réaction a lieu sur l'activité et la stabilité de l'enzyme. Même si certains travaux ont été réalisés avec d'autres enzymes, les hydrolases, et plus précisément les lipases, ont majoritairement été utilisées comme modèles d'études. La facilité de mise en oeuvre due à l'absence de cofacteur en est sans doute l'explication.

## **A.4. SYSTEMES ENZYMATIQUES METTANT EN JEU UN SOLVANT ORGANIQUE**

Plusieurs revues ont été publiées sur ce sujet. Certaines réunissent tous ces systèmes de manière générale et d'autres sont plus spécialisées dans un domaine. Ces systèmes peuvent être présentés selon deux classements : le premier privilégie la forme du biocatalyseur, soluble ou solide (Adlercreutz 1995); le second, quant à lui, est fonction de la nature micro ou macrohétérogène du milieu (Halling 1987, Khmelnitsky 1988). C'est ce dernier classement qui a été choisi. Il faut dire que de nombreuses méthodes ont été développées, certaines très simples et d'autres plutôt complexes. Beaucoup sont des "curiosités" de laboratoire et ne déboucheront sans doute jamais sur une application industrielle. Elles ont pourtant le mérite d'apporter une nouvelle vision et une meilleure compréhension du mécanisme catalytique.

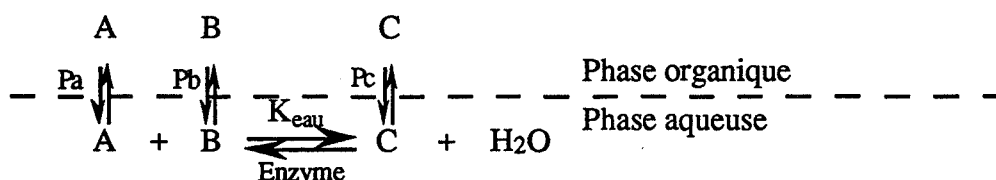
### **A.4.1. Milieux macrohétérogènes**

Les milieux macrohétérogènes regroupent les systèmes enzymatiques où phases enzymatique et organique se différencient à l'oeil nu, c'est-à-dire les systèmes biphasiques liquide-liquide, solide-liquide et solide-gaz.

#### **A.4.1.1. Systèmes biphasiques liquide-liquide**

Ces systèmes comprennent une phase enzymatique aqueuse et une phase organique non ou partiellement miscible. La phase organique sert à la fois de réservoir à substrats et de solvant extracteur des produits. La phase aqueuse peut ne représenter que quelques pour cent du volume total. Les réactions ont lieu dans la phase aqueuse et les cinétiques sont proches de celles obtenues en milieu purement aqueux. Pour augmenter les vitesses de réaction, il est important d'augmenter la surface de contact entre ces deux phases en créant une émulsion. La diffusion des composés vers le biocatalyseur est ainsi améliorée avec l'augmentation de la vitesse d'agitation (Harbron 1986). Cependant, ceci s'accompagne souvent de la dénaturation de l'enzyme par contact direct avec le solvant. Celle-ci peut être négligeable si le solvant est très peu miscible à l'eau (Klibanov 1977).

Ce système est de ce fait applicable aux substrats très peu solubles dans l'eau tels les stéroïdes (Cremonesi 1975, Ramelmeier 1989). Il peut être par ailleurs utilisé pour des réactions donnant de l'eau dans la mesure où le ou les produits se concentrent préférentiellement dans la phase organique (Figure A.4.1.1.a).

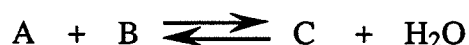


**Figure A.4.1.1.a** : Mécanisme réactionnel des systèmes biphasiques liquide-liquide à deux substrats et deux produits dont l'eau.

Avec :  $K_{\text{eau}}$  constante d'équilibre de la réaction en phase aqueuse,  $P_a$ ,  $P_b$  et  $P_c$  les coefficients de partage des composés A, B et C entre la phase organique et la phase aqueuse.

La quantité totale de produit C formé est fortement dépendante du rapport volumique des phases organique et aqueuse  $\alpha$ , de la constante d'équilibre de la réaction en phase aqueuse  $K_{\text{eau}}$  et des coefficients de partage des substrats et produits entre les deux phases (Martinek 1981, Khmelnitsky 1984, Eggers 1989).

Ainsi, pour la réaction



la concentration totale en C est déterminée par l'équation suivante :

$$[C]_{\text{total}} = K_{\text{eau}} \frac{(1 + \alpha P_c)(1 + \alpha)}{(1 + \alpha P_a)(1 + \alpha P_b)} \frac{[A]_{\text{total}}[B]_{\text{total}}}{55,5}$$

avec  $\alpha = V_{\text{org}}/V_{\text{aq}}$ ,  $K_{\text{eau}}$  constante d'équilibre de la réaction en phase aqueuse et  $P_a$ ,  $P_b$  et  $P_c$  les coefficients de partage entre la phase organique et la phase aqueuse des composés A, B et C respectivement.

Pour optimiser la réaction, il est nécessaire d'étudier certains paramètres tels la nature du solvant, le rapport  $\alpha$ , la température, le pH de la phase aqueuse et la vitesse d'agitation.

#### A.4.1.2. Milieux biphasiques solide-liquide

Ces milieux comprennent les systèmes où la phase catalytique est sous la forme solide en suspension : enzymes lyophilisées ou immobilisées.

#### A.4.1.2.1. Enzymes solides en suspension dans un milieu organique

Les protéines sont généralement insolubles dans les milieux organiques (Chin 1994). La mise en suspension de l'enzyme sous forme solide dans un milieu quasi organique à des fins catalytiques a été envisagée dès le début du siècle. Ce système se distingue par l'absence de phase aqueuse distincte. Jusque dans les années 60, ce type de système était banni car les chercheurs essayaient d'être les plus proches d'un environnement aqueux "*in vivo*". Or, certaines enzymes, principalement des hydrolases, sont actives dans des environnements naturels hydrophobes, où la concentration en eau est bien inférieure à 55 M. De ce constat est apparu ce type de système (Dordick 1989).

D'un point de vue vocabulaire, ces milieux sont parfois appelés milieux quasi anhydres (Zaks 1985), systèmes faiblement hydratés (Halling 1987), milieux biphasiques solide/liquide, mais le plus souvent le terme milieux microaqueux est employé (Yamane 1988).

Le milieu microaqueux, comme son nom l'indique, comporte, contrairement aux autres systèmes, une très petite quantité d'eau, le plus fréquemment inférieure à 1%. Cette eau a toutefois un rôle primordial sur l'activité et la stabilité de l'enzyme. Ce point sera développé dans le paragraphe A.5.. D'un point de vue pratique, cette présence d'une faible quantité d'eau favorise le déplacement des équilibres de nombreuses réactions au détriment de l'hydrolyse.

Plusieurs enzymes sont vendues sous forme solide. Sinon, à partir d'une solution aqueuse, il est nécessaire d'avoir recours à une étape de lyophilisation ou de précipitation par l'acétone. Les conditions de cette étape, c'est-à-dire le pH de la solution aqueuse, la présence d'impuretés, de sels ou de stabilisants, influenceront l'activité de la poudre enzymatique obtenue.

Comme tout milieu hétérogène, la diffusion des substrats et produits de la phase organique vers le biocatalyseur est généralement l'étape limitante pour les enzymes très actives. Les diffusions interne et externe doivent alors être prises en compte. La diffusion externe correspond au transfert du substrat de la phase organique à la surface du biocatalyseur et inversement pour le produit. La diffusion interne ou intraparticulaire, quant à elle, représente le transfert du substrat de la surface vers le site actif de l'enzyme.

Les limitations dues à la première diminuent avec l'augmentation de l'agitation jusqu'à une vitesse d'agitation optimale où ces limitations deviennent alors négligeables. Pour la seconde, il est nécessaire, soit de diminuer la taille de la poudre, ce qui est difficilement réalisable, soit d'immobiliser la poudre enzymatique sur un support de grande surface spécifique. C'est la deuxième méthode qui est utilisée.

#### A.4.1.2.2. Enzymes immobilisées

L'immobilisation d'enzymes a été grandement développée. La nature du support et le type d'immobilisation sont très variés et dénotent une grande part de créativité dans ce domaine. Le point a déjà été fait dans de nombreuses revues (Rosevear 1987). L'immobilisation, bien qu'à *priori* non nécessaire, est parfois souhaitable pour diminuer les problèmes de diffusion interne, mais aussi pour éviter les phénomènes d'agréation et de fixation de l'enzyme sur les parois du réacteur (Adlercreutz 1995). Ainsi, l'activité enzymatique observée est souvent supérieure à celle obtenue avec la poudre enzymatique lyophilisée. La présence du support semble généralement influencer positivement sur l'enzyme en la protégeant de l'inactivation pendant l'étape d'immobilisation-lyophilisation et en lui créant un microenvironnement favorable pendant la catalyse. Ceci est grandement dépendant de la nature du support employé.

##### *A.4.1.2.2.1. Techniques d'immobilisation*

Celles-ci peuvent être regroupées en 2 catégories en fonction du type de liaisons créées.

##### a) Par adsorption

C'est la technique la plus simple car il n'y a pas de réaction. Elle est valable dans la mesure où l'enzyme est insoluble dans le milieu organique. Elle consiste à mettre en contact la solution aqueuse contenant l'enzyme avec le support, puis d'éliminer l'eau ou de précipiter l'enzyme sur le support par l'addition d'acétone glacée (Ruckenstein 1993).

##### b) Par liaison covalente

Celle-ci est obligatoire si la réaction ou le milieu de réaction tend à faire désorber l'enzyme du support. C'est le cas pour certaines enzymes et solvants polaires miscibles à l'eau.

La création d'une liaison covalente entre la molécule d'enzyme et le support s'accompagne souvent d'une perte d'activité enzymatique. Cette dernière est due à une modification trop importante près du site actif, soit par réaction directe avec un résidu d'acide aminé proche du site actif, soit par création de nombreuses liaisons par molécule d'enzyme, entraînant des distorsions de la structure ou un accès très difficile au site actif. Ceci tend à limiter ce type d'immobilisation, même si pour des applications à grande échelle, l'immobilisation semble indispensable d'un point de vue pratique (collage sur les parois et agrégation de l'enzyme impossibles).

c) Limitations diffusionnelles

La taille et la surface spécifique des particules de support sont très importantes et contrôlables. Il faut les particules les plus petites (Bosley 1994) pour obtenir des vitesses de réaction élevées. La taille des pores peut également limiter la diffusion interne, mais il est très difficile d'obtenir des particules de diamètres de pores contrôlés. Les travaux de Bosley (1994) ont prouvé que ce diamètre doit être bien supérieur au diamètre de la molécule d'enzyme.

La surface spécifique doit être fonction de la quantité d'enzyme déposée : l'optimum serait de créer une monocouche d'enzyme sur la surface accessible du support (Wehtje 1993).

*A.4.1.2.2.2. Types de supports utilisés*

a) Supports minéraux

Ce sont les supports de choix pour l'immobilisation par adsorption. La célite a sans doute été la plus utilisée (Wisdom 1984, Macrae 1985, Adlercreutz 1991, Manjon 1991), mais d'autres supports sont également possibles : chromosorb (Wehtje 1992), silice et alumine (Brady 1988).

b) Polymères

Les lipases peuvent être utilisées adsorbées sur des polymères hydrophobes tels le polyéthylène, le polypropylène et le polystyrène. Cependant, avec ce type de support, il est préférable d'améliorer la fixation en formant des liaisons covalentes entre l'enzyme et le support. Ceci peut être réalisé, soit par réaction de la molécule d'enzyme avec un groupe activateur puis réaction avec un polymère, soit par réaction avec un monomère activé et polymérisation. La famille de polymères la plus employée est celle des polyesters acryliques (Ampon 1988, Fulcrand 1991). Les polyuréthanes, les alcools polyvinyliques, les polyamides, les polysaccharides, les gels d'agarose et les résines échangeuses d'ions sont également des supports possibles.

*A.4.1.2.2.3. Influence des propriétés du support*

La quantité d'eau et sa localisation dans le système influent grandement sur l'activité enzymatique. La présence d'un support peut modifier la répartition de cette eau. De ce constat est né le terme aquaphilie (Reslow 1988). L'aquaphilie d'un support représente le rapport entre la quantité d'eau adsorbée par le support et celle solubilisée dans le solvant. Le



solvant standard est l'éther diisopropylique saturé en eau. Ainsi, Reslow montre que l'activité enzymatique diminue en augmentant l'aquaphilie du support.

De même, la nature du support participe à la répartition des substrats et produits. Un support hydrophobe aura tendance à attirer les substrats hydrophobes et augmenter leurs concentrations au voisinage du site actif. Ceci peut être positif uniquement si le substrat n'est pas inhibiteur de l'enzyme.

Enfin, il est toujours possible que la nature du support agisse directement sur l'enzyme, en modifiant sa structure tridimensionnelle. Adlercreutz (1991) a ainsi montré le comportement différent de la chymotrypsine adsorbée sur un support polyamide, vis-à-vis d'autres supports.

Les supports plutôt hydrophobes, la célite par exemple, permettent des activités enzymatiques plus élevées (Reslow 1988, Norin 1988).

#### A.4.1.2.3. Solvants utilisés

La nature de la phase organique dans ce type de milieux est très variée et dépend beaucoup de la réaction et de l'enzyme envisagées. Le choix du solvant est généralement déterminant. Cette étape est appelée ingénierie du milieu et sera développée dans le paragraphe A.6. *A priori* tous les solvants organiques peuvent être employés dans la mesure où ils n'agissent de façon négative ni sur la réaction, ni sur l'enzyme. En particulier, ils ne doivent pas solubiliser ou désorber les enzymes immobilisées par simple adsorption. La gamme de solvants est très large : du plus hydrophile et polaire au plus hydrophobe et apolaire (Laane 1987). Il est possible également d'employer des fluides super-critiques (Nakamura 1990, Chulalaksananukul 1990 et 1992).

De la même façon, il est possible de travailler sans solvant, c'est-à-dire que les substrats jouent également le rôle de solvant, dans la mesure où les substrats sont liquides et ne sont pas inhibiteurs de l'enzyme. Ceci est déjà utilisé dans la transformation des glycérides par transestérification (Bornscheuer 1994), pour la synthèse d'esters terpéniques (Fonteyn 1994) et l'acylation de glucosides (Adelhorst 1990).

#### A.4.1.3. Milieux biphasiques solide-gaz

La phase gazeuse, composée principalement de substrats à l'état gazeux, est en contact avec l'enzyme à l'état solide lyophilisée ou immobilisée (Pulvin 1986, Lamare 1993 et 1995, Parvaresh 1992) à l'intérieur d'un réacteur à lit fixe. Plusieurs enzymes ont été utilisées dans ce type de systèmes. Il est toutefois plus avantageux d'utiliser des enzymes thermostables,

car de plus hautes températures sont nécessaires pour maintenir les substrats en phase gazeuse.

La faible teneur en eau est également primordiale pour obtenir l'activité maximale.

L'avantage supplémentaire du milieu solide-gaz par rapport aux autres systèmes est l'absence de solvants. Ce milieu n'est cependant utilisable que pour des petites molécules facilement vaporisables.

#### **A.4.2. Milieux microhétérogènes**

Les enzymes natives sont en général insolubles dans les milieux organiques. Cependant, pour certaines applications, il est intéressant de travailler avec une enzyme soluble. Ceci peut être obtenu par modification, soit de l'enzyme, soit de son microenvironnement. Le terme milieux microhétérogènes regroupe les systèmes enzymatiques dans lesquels l'enzyme est rendue soluble dans le milieu organique et une seule phase est visible à l'oeil nu.

##### **A.4.2.1. Enzymes modifiées de façon covalente**

Un des moyens de solubiliser une enzyme en milieu organique est de rendre sa surface plus hydrophobe. Ceci peut être réalisé en la faisant réagir avec un polymère hydrophobe activé.

Le polymère le plus utilisé est le polyéthylène glycol (PEG) (Inada 1986). L'obtention de la PEG-enzyme se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, il faut créer une entité activée en faisant réagir le monométhoxy polyéthylène glycol avec le chlorure de cyanogène. L'intermédiaire est alors attaqué par les fonctions amine de l'enzyme pour obtenir la PEG-enzyme. Deux molécules de PEG sont fixées par groupement amine (Figure A.4.2.1.a). Il existe d'autres techniques en passant, par exemple, par une activation par le chloroformate.

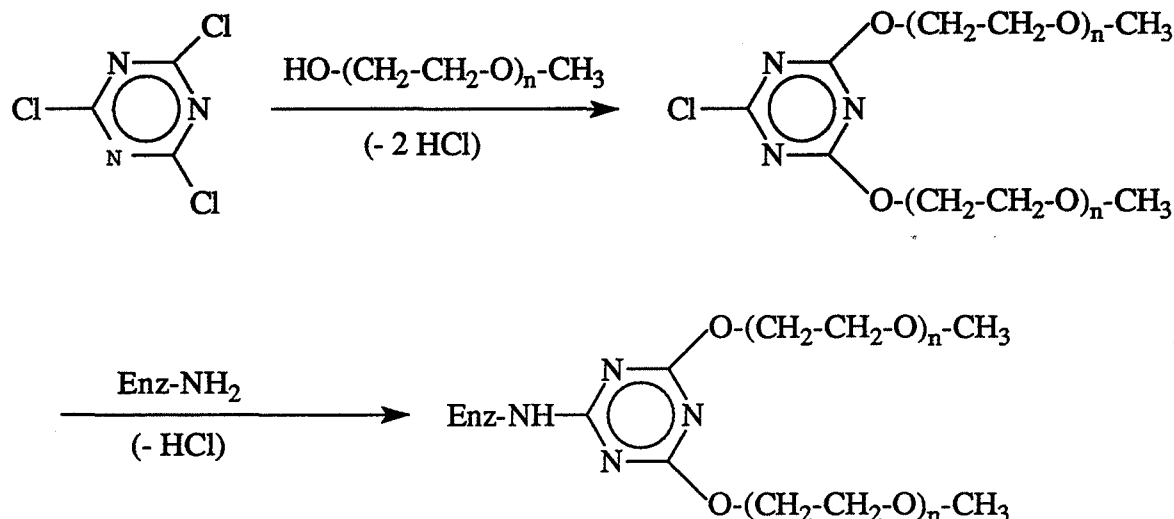
Cette phase de modification de l'enzyme engendre souvent une perte d'activité non négligeable. De plus, la solubilité du biocatalyseur obtenu augmente avec le degré de modification. Le meilleur compromis entre solubilisation et maintien d'activité est la modification d'un résidu aminé sur deux.

Le biocatalyseur ainsi modifié est soluble dans les solvants halogénés, chloroforme et tétrachlorure de carbone, et aromatiques, benzène et toluène.

La PEG-enzyme n'est cependant pas réellement soluble dans ces milieux, et il peut exister des limitations diffusionnelles dans ce type de milieu. En effet, il s'avère que la

PEG-enzyme est une fine suspension avec des diamètres de particules de 300 nm (Khan 1992).

Macroscopiquement, la solution est limpide et homogène, et des analyses spectroscopiques directes peuvent être envisagées pour le suivi de réaction.



**Figure A.4.2.1.a : Préparation de la PEG-enzyme.**

D'autres polymères permettent cette "solubilisation". L'enzyme modifiée par le polystyrène est obtenue après activation par l'acide azo bis (4-cyanovalérique) des groupes amine des résidus de la trypsine, réaction avec le styrène et polymérisation *in situ*. Elle est soluble dans le chloroforme.

Le poly(N-vinylpyrrolidone) et le polyméthacrylate de méthyle peuvent être employés de la même manière.

Cependant, les applications sont réduites car cette modification est onéreuse et il faut des étapes supplémentaires pour récupérer l'enzyme modifiée. La récupération a lieu, soit par précipitation à l'aide d'un solvant non-polaire (hexane), soit par filtration à travers une micromembrane.

C'est tout de même le meilleur moyen pour transformer les substrats à l'état solide, en particulier pour la synthèse de peptides.

#### A.4.2.2. Complexes non-covalents

Les tensioactifs cationiques et non-ioniques, tel que le didodécylglucosyl glutamate, créent des complexes avec les enzymes. Ces complexes enzyme-tensioactif sont solubles dans les solvants plutôt hydrophobes : l'éther diisopropylique, le benzène, le toluène et l'hexane. L'enzyme est facilement récupérable, car le complexe précipite en ajoutant de l'eau. Il faut environ 150 molécules de tensioactif par molécule d'enzyme.

Il faut signaler que la taille de l'alkyle, couramment le dodécyl, influe sur la vitesse de réaction.

Il est, de plus, possible de former des complexes enzyme-polymère. L'éthyl-cellulose est le polymère de choix. Un tel complexe est obtenu par lyophilisation d'une solution aqueuse contenant l'enzyme et le polymère. D'autres polymères peuvent également être employés : PEG, polyméthacrylate de méthyle,...(Otamiri 1992a et b).

La nature et la quantité de sels de la préparation ont un rôle déterminant sur la formation du complexe. Comme pour les complexes enzyme-tensioactif, l'ajout d'eau permet de récupérer l'enzyme.

Ces complexes ont toutefois une thermostabilité très faible.

#### A.4.2.3. Micelles inverses

Un autre moyen de dissoudre l'enzyme est d'ajouter un tensioactif permettant de stabiliser une émulsion d'une solution aqueuse d'enzyme dans un solvant organique non-miscible. L'émulsion obtenue, formée de micelles inverses, est un mélange isotrope et homogène macroscopiquement. Cette homogénéité apparente permet des études spectroscopiques pour suivre, bien entendu, la réaction envisagée, mais aussi les modifications de conformation et de structure de la protéine dans ce type de milieu.

D'un point de vue microscopique, les micelles sont composées d'une gouttelette d'eau solubilisant l'enzyme, entourée par des molécules de tensioactif dont l'orientation est dictée par la polarité. La partie hydrophile, appelée tête, se retrouve en contact avec la phase aqueuse, alors que la queue, chaîne carbonée hydrophobe, est orientée vers l'extérieur dans le solvant organique (Figure A.4.2.3.a). La taille des micelles inverses est comprise entre 1 et 10 nm (Khmelnitsky 1988).

Le tensioactif Aérosol OT est le plus largement utilisé. Son nom chimique est le bis-(2-éthylhexyl) sulfosuccinate de sodium. D'autres tensioactifs tels le CTAB (bromure de cétyle triméthyl ammonium), le Triton, le Tween,..., ont été employés. Les solvants organiques sont principalement des hydrocarbures et hydrocarbures chlorés.

Ce procédé permet d'augmenter la surface de contact entre le milieu organique et la phase aqueuse enzymatique.

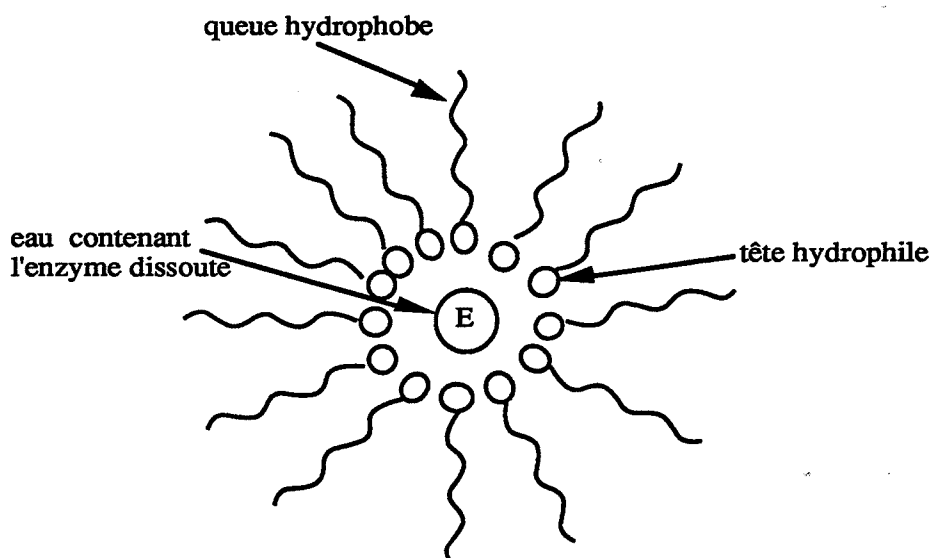


Figure A.4.2.3.a : Schéma d'une micelle inverse.

Le rapport molaire eau sur tensioactif, appelé  $w_o$ , influe sur la taille des micelles et donc sur les cinétiques de réaction. La quantité d'eau dans ces milieux est comprise entre 1 et 5% en volume. Il a été noté que l'eau, à l'intérieur des micelles inverses, présente des propriétés différentes : viscosité, polarité, acidité, nucléophilie, etc... (Luisi 1984). Certains attribuent cette modification de propriétés au fait que l'eau est liée aux molécules de tensioactif (Luisi 1986, Martinek 1989). Cette différence disparaît avec l'addition d'eau.

Pour les lipases, l'enzyme a tendance à s'insérer dans la couche de tensioactif et retrouve ainsi un environnement interfacial proche du vivant.

Ce système est complexe et le principal frein à son développement est la phase de récupération des produits et de l'enzyme grandement gênée par la présence du tensioactif. La possibilité de travailler sans tensioactif avec le mélange ternaire eau-hexane-isopropanol permet de contourner ce problème (Khmelnitsky 1987).

### A.4.3. Conclusion

Plusieurs possibilités existent donc pour travailler en milieu organique. Seules les techniques les plus employées ont été développées succinctement dans ce paragraphe. En particulier, l'eau, pour tous les systèmes, est primordiale. Ceci est développé dans le paragraphe suivant dans le cas des milieux microaqueux.

## **A.5. ROLE DE L'EAU DANS LES REACTIONS EN MILIEUX ORGANIQUES MICROAQUEUX**

L'eau est le facteur clé de la catalyse enzymatique en milieu organique. La quantité d'eau présente et sa localisation dans le système jouent un rôle déterminant pour l'activité et la stabilité de l'enzyme.

### **A.5.1. Quantité d'eau**

Une enzyme sèche n'est pas active en milieu organique anhydre. Un minimum d'eau est, en effet, nécessaire pour observer une activité catalytique (Takahashi 1988, Goldberg 1990). Quelques dizaines de molécules d'eau par molécule d'enzyme suffisent souvent. En particulier, pour la chymotrypsine, ce minimum est de l'ordre de 50 molécules d'eau (Zaks 1988a), alors que l'alcool oxydase et la déshydrogénase ont besoin de 100 molécules d'eau (Zaks 1988b). Les lipases, quant à elles, demandent moins de 50 molécules d'eau (Valivety 1992a,b et c). Ce chiffre est largement inférieur à la quantité d'eau nécessaire pour former une monocouche autour du biocatalyseur.

La quantité d'eau minimale dépend du système catalytique envisagé : nature de l'enzyme, solvant organique, substrats et produits, type de réacteur. L'eau, en effet, se répartit dans le système entre les différentes phases en présence en fonction de leur caractère hydrophile (Zaks 1988b). La présence d'un support, d'impuretés organiques et minérales, de sels et de stabilisants dans la poudre enzymatique peut faire varier énormément la quantité d'eau nécessaire. Ainsi, deux lots de la même enzyme, provenant de deux fournisseurs différents, peuvent présenter des activités différentes pour la même quantité d'eau introduite dans le système.

L'activité enzymatique est très sensible à la quantité d'eau présente : une faible variation de la quantité d'eau se traduit souvent par de grandes modifications de cinétique.

Généralement, un minimum d'eau ne suffit pas pour observer une activité optimale. D'un point de vue cinétique, il est impératif de travailler avec une quantité d'eau optimale. Ceci est parfaitement observable pour les réactions créant de l'eau. Une quantité d'eau trop faible au départ de la réaction a pour conséquence une allure sigmoïdale de la courbe représentative de la concentration en produit formé en fonction du temps de réaction. En effet, l'eau formée au cours de la réaction active à son tour les molécules d'enzyme non-actives. Cet effet autocatalytique complique énormément les tentatives de modélisation.

Par contre, au-delà de l'optimum, donc si trop d'eau est présente, la poudre enzymatique a tendance à s'agréger. Pour Liu, cette agrégation correspond à la formation de

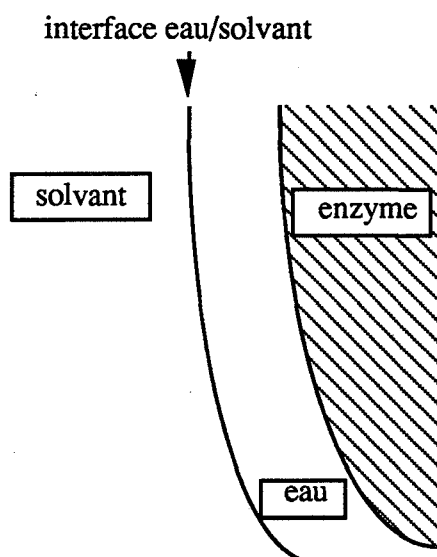
ponts disulfure (Liu 1991). Ceci s'accompagne de limitations diffusionnelles et d'une perte apparente d'activité enzymatique.

Par conséquent, il faut trouver un compromis qui permet d'obtenir une activité catalytique optimale.

### **A.5.2. Localisation de l'eau dans le système**

L'eau se répartit dans le système en fonction des affinités des différentes phases pour elle. L'activité enzymatique est fonction en fait de l'eau adsorbée sur la molécule d'enzyme (Zaks 1988a) (Figure A.5.2.a).

Rupley et Careri ont étudié les différentes étapes de l'adsorption d'eau sur le lysozyme sec dans l'air et ont généralisé leurs études aux protéines globulaires (Rupley 1983, 1991). Ils distinguent trois étapes. Entre 0 et 60 molécules d'eau par molécule de lysozyme, la structure de la protéine est similaire à celle observable en solution aqueuse. L'eau s'adsorbe sur les sites comportant des résidus chargés : c'est l'étape de germination. Aucune activité enzymatique n'est observée. A 60 molécules d'eau, un réarrangement des molécules d'eau s'opère : les molécules d'eau désordonnées se regroupent alors en amas ordonnés autour des groupes chargés.



**Figure A.5.2.a :** Présence d'une couche d'eau autour de l'enzyme.

De 60 à 220 molécules d'eau, l'eau s'associe principalement avec les groupes polaires. Des amas de molécules d'eau de taille variable se forment à la surface de l'enzyme. La mobilité des molécules d'eau augmente : l'eau passe d'une structure type solide à un arrangement type liquide. L'activité enzymatique est négligeable et apparaît vers 180 molécules d'eau adsorbées.

Entre 200 et 300 molécules d'eau, l'eau se condense sur la surface peu et apolaire. L'activité enzymatique et le mouvement des molécules d'eau augmentent. L'enzyme se comporte comme en milieu aqueux.

A 300 molécules d'eau par molécule de lysozyme, une monocouche d'eau est formée : des arrangements locaux et ordonnés des molécules d'eau existent autour des résidus chargés et polaires. Ces arrangements privilégient un recouvrement maximal de la surface par molécule d'eau : une molécule d'eau recouvre en moyenne 20 Å<sup>2</sup>.

De ces observations, il résulte qu'il existe deux sortes de molécules d'eau à la surface d'une enzyme. La première est appelée parfois eau liée, car elle est très difficile à éliminer. Elle se retrouve sur les sites chargés et polaires. Sa structure est assez bien définie et se rapproche de l'état solide. Elle intervient dans la structure de la protéine en participant à toutes les forces et interactions maintenant la structure tertiaire de l'enzyme : liaisons hydrogène, forces électrostatiques, etc...

Certaines modifications de la surface protéique par mutations ont démontré l'importance du couple acide aminé polaire ou chargé/eau liée dans le maintien de la structure enzymatique active.

La deuxième catégorie d'eau est beaucoup moins fondamentale pour la structure protéique. C'est l'eau présente sur la surface non-polaire. Elle intervient plus sur l'activité enzymatique, et est facilement éliminable, soit à pression réduite, soit par des solvants miscibles à l'eau.

### **A.5.3. Rôle de l'eau au niveau moléculaire**

La pellicule d'eau adsorbée protège l'enzyme des dénaturations pouvant être causées par le solvant. Elle sert de milieu tampon et est le premier composant du microenvironnement de l'enzyme (Khmelnitsky 1988).

L'eau participe à toutes les liaisons et interactions maintenant l'enzyme dans sa conformation native : l'eau est considérée comme un lubrifiant moléculaire (Mattiasson 1991). L'ajout d'eau augmente la flexibilité de toutes les régions de la structure native, ainsi que la polarité au niveau du site actif (Rupley 1983). Ces deux phénomènes semblent aller de pair avec l'activité enzymatique. La flexibilité totale est obtenue pour une hydratation complète de l'enzyme, c'est-à-dire lorsque sa surface est complètement recouverte par une monocouche d'eau.

L'hydratation des groupes chargés et polaires est indispensable à la catalyse : sans eau, les interactions attractives et répulsives entre ces différents groupes sont sans doute trop importantes et créent une conformation inactive bloquée (Zaks 1988b).



Les interactions électrostatiques dominent plus particulièrement le contrôle du comportement catalytique. En effet, le remplacement d'une partie de l'eau par des molécules de solvants formant des liaisons hydrogène, le glycérol ou le formamide par exemple, permet d'observer des activités enzymatiques voisines. En particulier, l'addition de 3% de formamide dans l'octanol contenant 1% d'eau augmente 35 fois l'activité de la polyphénol oxydase (Zaks 1988b). Toutefois, l'eau fortement liée ne peut être remplacée par ces molécules.

#### **A.5.4. Relation activité enzymatique-activité en eau**

En milieu microaqueux la quantité d'eau présente peut ne représenter que 0,01% du volume total. Au niveau de l'enzyme, ce chiffre peut être encore plus faible. La quantité d'eau totale dans le système n'est cependant pas représentative de l'eau adsorbée sur l'enzyme, à moins de travailler avec le même système.

L'activité en eau  $a_w$  est souvent utilisée pour définir la quantité d'eau présente dans chaque phase d'un système hétérogène (Halling 1989a). Dans un système hétérogène,  $a_w$  représente le rapport entre la pression partielle en eau au-dessus du système et la pression partielle en eau au-dessus de l'eau pure à l'équilibre dans les mêmes conditions de température et de pression. Sa valeur est donc comprise entre 0 et 1.

Travailler à  $a_w$  déterminée permet d'avoir des conditions d'hydratation identiques quels que soit l'enzyme, le solvant, le réacteur et la réaction envisagés. L'activité en eau est identique dans toutes les phases en présence, alors que la quantité d'eau dans les différentes phases est différente. Par conséquent, travailler à  $a_w$  fixée permet d'avoir la même hydratation de l'enzyme et de faire des comparaisons entre plusieurs lots d'enzyme, entre différents solvants et entre différents supports sans interaction avec la quantité d'eau présente (Halling 1990).

Il existe 3 méthodes pour obtenir une activité en eau donnée. Il est possible d'ajouter directement de l'eau, mais cette quantité d'eau est différente selon la nature du solvant. La deuxième méthode consiste à pré-équibrer séparément tous les composants du système au-dessus d'une solution aqueuse saturée en sels et d'activité en eau connue (Valivety 1992b). Enfin, l'addition de sels hydratés directement dans le réacteur permet de réguler l'activité en eau lors de la réaction (Halling 1992, Kvittingen 1992, Yang 1993).

Comme il existe une quantité d'eau optimale, il y a une activité en eau optimale. Cette valeur est indépendante du solvant et de la concentration en substrats et produits, dans la mesure où ceux-ci n'interagissent pas avec l'enzyme. Par contre, elle est dépendante de

l'enzyme : la polyphénol oxydase (Yang 1991) et l' $\alpha$ -chymotrypsine (Blanco 1992) ont une activité optimale pour une  $a_w$  de 1, c'est-à-dire lorsqu'une monocouche d'eau est formée, alors que la lipase de *Mucor miehei* reste fortement active pour  $a_w$  inférieure à 0,0001. L'activité en eau optimale pour les lipases est comprise entre 0,12 et 1 (Valivety 1992b).

Par ailleurs, pour les réactions créant de l'eau, la position de l'équilibre final est dépendante de  $a_w$ . L'équilibre thermodynamique sera plus fortement déplacé vers la synthèse d'esters ou d'amides si  $a_w$  est minimisée. C'est souvent en contradiction avec la cinétique en début de réaction qui demande une activité en eau plus élevée.

### **A.5.5. Nouvelles propriétés des enzymes en milieux pauvres en eau**

#### **A.5.5.1. Rigidification de la structure de la molécule d'enzyme**

En milieux pauvres en eau, la catalyse enzymatique a lieu du fait d'une certaine rigidification de la structure protéique. En milieu organique, l'enzyme est bloquée dans sa structure spatiale native : ceci a été observé par cristallographie RX (Fitzpatrick 1993, Yennawar 1994) et par RMN (Burke 1992, 1993). En effet, les modifications spatiales nécessitent une certaine flexibilité apportée par un environnement aqueux et, plus particulièrement par les liaisons hydrogène.

La catalyse enzymatique en milieu microaqueux est ainsi expliquée par la rigidification de la structure à l'état native, et plus précisément dans la région du site actif.

Cette rigidification apporte des propriétés nouvelles aux biocatalyseurs.

##### **A.5.5.1.1. Mémoire pH**

Il a été montré par l'équipe de Klibanov (Kazandjian 1985, Zaks 1985, 1988a) pour la polyphénol oxydase, la lipase pancréatique de porc et l' $\alpha$ -chymotrypsine que l'activité enzymatique est dépendante du pH de la solution aqueuse à partir de laquelle la poudre enzymatique a été obtenue. Ce phénomène est appelé mémoire pH. En effet, certains groupements ionogènes acquièrent un état d'ionisation en milieu aqueux qui est conservé lors de l'étape de lyophilisation ou de précipitation, puis en milieu organique.

Ainsi, l'activité enzymatique peut être "modélée" lors du conditionnement de l'enzyme à partir de la solution aqueuse. En fonction du pH de lyophilisation de la poudre enzymatique, l'activité enzymatique de la poudre commerciale peut être améliorée ou au contraire réduite (Figure A.5.5.1.1.a). En utilisant un tampon avec une force ionique et un

pH adaptés, il est possible d'atteindre une conformation donnant l'activité enzymatique optimale. La valeur du pH correspond souvent au pH optimal de l'enzyme en milieu aqueux.

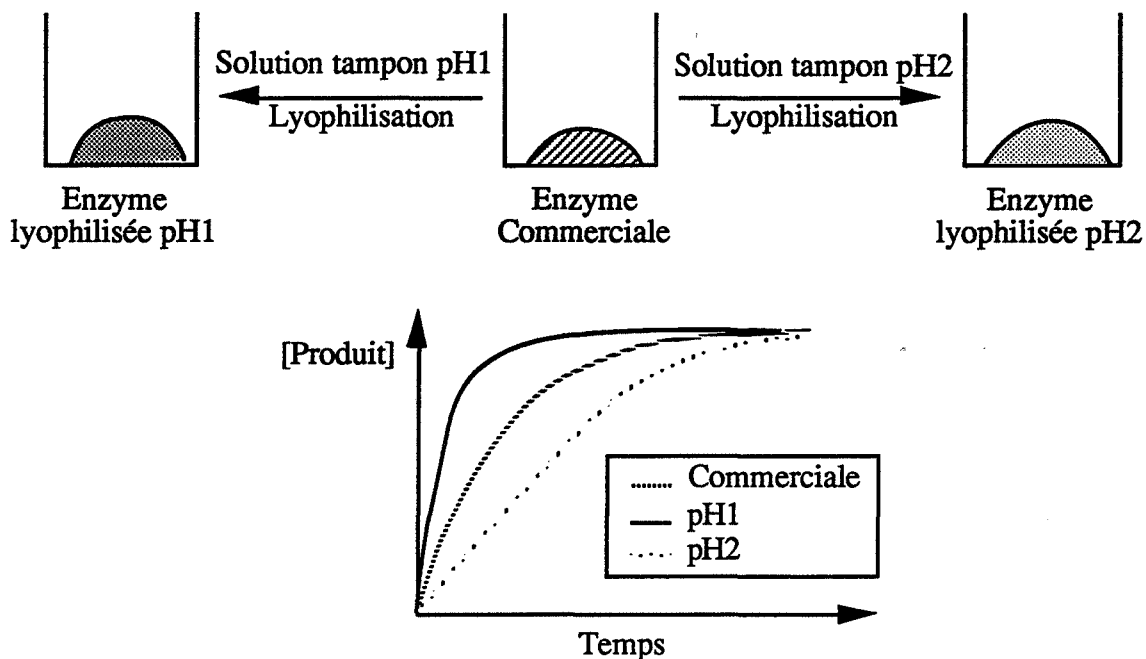


Figure A.5.5.1.1.a : Mise en évidence de la mémoire pH.

#### A.5.5.1.2. Empreinte moléculaire

Sur le même principe, il est possible d'améliorer les propriétés catalytiques de l'enzyme en milieu organique. En introduisant avant la lyophilisation une molécule complexante, inhibiteur de l'enzyme interagissant avec le site actif en milieu aqueux, le site actif de l'enzyme reste bloqué dans une certaine conformation : l'inhibiteur a laissé son "empreinte" dans le site actif. Après lyophilisation, un lavage avec un solvant organique permet d'éliminer l'inhibiteur. La taille et la forme des cavités au niveau du site actif sont maintenues à cause de la rigidification de la structure enzymatique en milieu organique. Par ce procédé, la sélectivité vis-à-vis du substrat est grandement changée. Russell (1988) a ainsi augmenté la vitesse de transestérification de l'ester méthylique de la N-acétyl-L-Alanine par le n-propanol par un facteur 100 en employant un inhibiteur approprié.

Par ailleurs, Stahl, en introduisant le N-acétyl-D-Tryptophane dans la phase aqueuse avant la lyophilisation, a façonné le site actif de la chymotrypsine pour qu'il accepte cet isomère dextrogyre comme substrat. Pourtant, à l'état naturel, cette enzyme, comme la majorité des enzymes, n'accepte que l'autre énantiomère (Stahl 1990).

#### A.5.5.1.3. Altération de la sélectivité

La rigidification de la structure a également pour conséquence une altération de la sélectivité de l'enzyme. Ceci est principalement dû à l'impossibilité d'accommoder la conformation du site actif aux substrats de grande taille par manque d'eau : l'accessibilité des substrats aux sites actifs est contrôlée. Ainsi, la lipase pancréatique de porc ne catalyse l'estérification que de substrats de petites tailles en milieu sec, alors qu'en augmentant son hydratation, sa sélectivité est plus large car elle accepte également les substrats encombrants tels les alcools tertiaires (Zaks 1984).

#### A.5.5.2. Thermorésistance

Jusqu'ici, seules les améliorations des propriétés catalytiques ont été développées. Or, travailler en milieux pauvres en eau permet aussi une augmentation de la thermorésistance des enzymes. La dénaturation d'une enzyme est fonction de la température et de la quantité d'eau présente. Les milieux microaqueux, pauvres en eau, favorisent la stabilité thermique des biocatalyseurs. Les exemples dans la littérature sont abondants. La demi-vie de la lipase pancréatique de porc est de 12 h en milieu organique à 100°C alors que cette enzyme est quasi instantanément inactivée en milieu aqueux à cette température (Zaks 1984). De même, le lysozyme a une demi-vie de 140 h dans le cyclohexane à 110°C et inférieure à 10 min en milieu aqueux (Ahern 1985).

Le mécanisme de dénaturation de l'enzyme comprend un grand nombre d'étapes. Toutes les réactions nécessitent la présence d'eau. La première phase passe vraisemblablement par un dépliement réversible de la chaîne polypeptidique : ceci n'est possible que si l'eau et la température augmentent la flexibilité de la protéine. L'exposition de groupes réactifs enfermés dans la structure globulaire entraîne la phase de dénaturation irréversible. Ceci inclut un nombre de réactions important : déamidation ou transamidation des asparagines et des glutamines avec les groupes  $\epsilon$ -aminés des lysines, hydrolyse des liaisons peptidiques des résidus de l'acide aspartique, destruction et réarrangements des ponts disulfure, oxydation des cystéines, isomérisation des prolines,  $\beta$ -élimination des résidus de la cystine (Volkin 1991, 1995).

Remplacer l'eau par un solvant organique permet d'augmenter la thermostabilité de l'enzyme tout en préservant une activité enzymatique complète et de travailler à températures plus élevées. De ce fait, les vitesses de réaction sont plus élevées car les limitations diffusionnelles des substrats et des produits à l'interface eau-solvant organique diminuent avec la température (Wan Yunus 1992).

## **A.6. ROLE DU SOLVANT ORGANIQUE**

Le solvant sert à la fois de réservoir à substrats et de solvant d'extraction pour les produits. Au-delà de son usage premier, il influence directement ou indirectement l'activité et la stabilité de l'enzyme. Il intervient également sur la réaction.

### **A.6.1. Nature du solvant**

Son choix est le plus souvent dicté par le système employé. Alors qu'il est possible d'employer une grande partie des solvants dans les milieux macrohétérogènes, les milieux microhétérogènes sont plus limités car le solvant doit permettre de "solubiliser" le biocatalyseur. C'est pourquoi seul le cas des milieux macrohétérogènes nécessitant un solvant organique (les milieux solide-gaz sont donc exclus) sera abordé dans ce paragraphe. Parmi les 200 solvants couramment utilisés, il est important de mettre en évidence une relation simple entre l'un des paramètres du solvant et l'activité enzymatique pour effectuer un choix rapide.

Il est, tout de même, intéressant de présenter l'influence d'un solvant miscible à l'eau, ajouté dans un système purement aqueux. L'activité catalytique est peu modifiée jusqu'à une quantité critique de solvant. Cette chute brutale de l'activité ne permet pas de dépasser des concentrations en solvant supérieures à 50-70% (v/v). Le solvant tend à remplacer l'eau qui maintient la structure native de l'enzyme. Ce phénomène d'inactivation est en corrélation avec l'hydrophobie du solvant caractérisée par son  $\log(P)$ .  $P$  représente le coefficient de partage du solvant entre le n-octanol et l'eau, c'est-à-dire que plus  $\log(P)$  est important, plus le solvant est hydrophobe. Ainsi, plus le solvant est hydrophile ( $\log(P)$  faible), plus l'inactivation a lieu pour des concentrations en eau faibles. Les solvants hydrophiles miscibles, et plus particulièrement les polyols, sont donc moins inhibiteurs (Khmelnitsky 1991a).

Cependant, le facteur hydrophobie du solvant est souvent insuffisant : il faut prendre en compte la géométrie moléculaire du solvant et sa capacité de solvation (Khmelnitsky 1991a).

Ce constat a abouti à un modèle permettant de déterminer la capacité de dénaturation en fonction de plusieurs paramètres intrinsèques du solvant. Ce modèle n'est valable que pour les solvants miscibles.

Les solvants, dits non-miscibles, ne sont pas assez solubles dans l'eau pour atteindre cette limite d'inactivation. Cependant, deux types d'inactivation peuvent avoir lieu : la toxicité moléculaire et la toxicité de phase. La première est dépendante de la solubilité du solvant dans la pellicule aqueuse, alors que la seconde est déterminée par la nature de

l'interface pellicule d'eau/solvant organique (Bar 1986). Le type d'inactivation dépend du tandem enzyme-solvant choisi.

Parmi tous les paramètres utilisés décrivant le solvant, il semble que la corrélation activité enzymatique- $\log(P)$  du solvant, développée par Laane (1987), soit la plus satisfaisante même si de nombreuses exceptions existent. L'hydrophobie du solvant, en effet, ne prend pas en compte les interactions directes entre le solvant et le biocatalyseur. Le  $\log(P)$  d'un solvant peut être déterminé expérimentalement en mesurant  $P$ , le coefficient de partage du solvant dans un binaire octanol-eau. Il est également possible de calculer le  $\log(P)$  en additionnant les constantes fragmentales hydrophobes des différents groupes présents dans le solvant (Rekker 1977). Les courbes activité enzymatique en fonction du  $\log(P)$  présentent la même allure sigmoïdale pour différentes enzymes : les lipases (Zaks 1985), la cholestérol oxydase, la xanthine oxydase et l'énoate réductase. Trois catégories de solvants peuvent ainsi être distinguées. L'activité enzymatique dans les solvants polaires et miscibles à l'eau, ayant un  $\log(P)$  inférieur à 2, est faible. Pour des solvants ayant un  $\log(P)$  compris entre 2 et 4, l'activité est variable et modérée. Enfin, elle est importante pour des solvants hydrophobes ayant un  $\log(P)$  supérieur à 4 (Tableau A.6.1).

Nature du solvant	Solubilité dans l'eau à 20°C (% v/v)	$\log(P)$	Activité enzymatique
Miscible à l'eau	>0,4	<2	Faible
Partiellement miscible	0,04-0,4	2-4	Modérée
Peu ou non-miscible	<0,04	>4	Elevée

**Tableau A.6.1** : Relation entre l'hydrophobie du solvant  $\log(P)$  et l'activité enzymatique.

D'autres paramètres représentant l'hydrophobie du solvant, en particulier le paramètre de solubilité d'Hildebrand, associé à la masse moléculaire du solvant, et le moment dipolaire, ont été mis en avant. Les corrélations sont toutefois faibles. Certains préconisent d'utiliser la constante diélectrique du solvant (Laane 1987) qui n'est pas reliée à  $\log(P)$ . Ainsi, un alcool et un autre solvant peuvent avoir des  $\log(P)$  proches et des constantes diélectriques différentes. Une corrélation apparaît mais n'est valable que pour les solvants relativement polaires et miscibles à l'eau. Pour des constantes diélectriques inférieures à 6, plus aucune corrélation n'est valable. En effet, tous les alcanes hydrophobes de plus de 6 carbones ont une constante diélectrique nulle, alors que leur hydrophobie est différente.

### A.6.2. Influence du solvant sur le biocatalyseur hydraté

Le solvant, et plus généralement le milieu organique, peut agir à la fois sur l'enzyme directement et sur sa couche d'hydratation. Ainsi, l'hydrophilie du milieu peut entraîner la désorption de la couche d'eau maintenant la conformation active (Khmelnitsky 1988, Zaks

1988b, Arnold 1990, Welsh 1990). L'enzyme insuffisamment hydratée aura alors une activité faible. Par contre, un solvant hydrophobe sera moins enclin à ôter cette pellicule d'eau essentielle.

Le milieu organique et l'enzyme sont donc en compétition pour l'eau. L'équipe de Dordick (Gorman 1992) s'est penchée sur ce phénomène, en étudiant la désorption d'eau tritiée pour 3 enzymes différentes en présence de plusieurs solvants. La désorption est rapide et a lieu avec tous les solvants, mais elle est proportionnelle à l'hydrophilie du solvant. Alors qu'elle est de l'ordre de 60% dans le méthanol, elle n'est que de 0,5% dans l'hexane. Ceci peut être mis en relation avec le  $\log(P)$  du solvant. De plus, la désorption est dépendante de l'enzyme : la désorption, en présence de solvants peu à très polaires, est plus importante pour la peroxydase de raifort que pour la chymotrypsine. Par ailleurs, ils ont mis en évidence qu'il existe un équilibre dynamique entre l'eau liée et l'eau présente dans le milieu organique. Ce phénomène entraîne des distorsions dans la pellicule d'eau, autorisant l'accès du solvant vers l'enzyme.

L'hydrophilie du milieu, par conséquent, impose une certaine quantité d'eau pour obtenir une activité optimale. Pour réduire la désorption d'eau, certains envisagent l'augmentation de la polarité de la surface enzymatique par réaction chimique (Khmelnitsky 1991b) ou par immobilisation sur un support hydrophile (Laane 1987). Ceci permet de maintenir l'eau autour de l'enzyme.

D'autre part, le solvant peut avoir un effet négatif en interagissant directement avec l'enzyme. La dynamique de la protéine et du centre actif est réduite lorsque l'hydrophobie du solvant augmente (Affleck 1992). Certains solvants hydrophiles altèrent partiellement la conformation native de la protéine; le site actif est alors souvent atteint. Ceci est principalement la conséquence de la désorption de la couche d'eau protectrice : cette eau participe à toutes les liaisons et interactions maintenant la structure native. Les structures tertiaire et secondaire sont alors altérées (Singer 1962). Le solvant peut se comporter comme un inhibiteur de l'enzyme : l'acétate d'éthyle est un inhibiteur compétitif de deux hydroxystéroïde déshydrogénases (Carrea 1979), le toluène est un inhibiteur de la chymotrypsine (Reslow 1987). Enfin, les molécules de solvant peuvent pénétrer dans le site actif et diminuer la polarité locale du site, rendant difficile la fixation du substrat sur l'enzyme.

### **A.6.3. Influence du solvant sur la réaction**

Les solvants ont été utilisés avant tout pour augmenter la solubilité des substrats hydrophobes. Une des conséquences a été la possibilité de déplacer les équilibres faisant intervenir l'eau en faveur de la synthèse d'esters et d'amides. Cependant, le solvant n'est pas inerte vis-à-vis de la réaction. Il modifie le partage des substrats et produits entre les

différentes phases. Si le partage est en défaveur de la phase aqueuse, la diffusion des substrats peut devenir alors l'étape limitante. Si c'est le contraire, une inhibition par excès de substrat peut être observée. La constante d'équilibre de la réaction est fonction de la nature du solvant et de la solubilité de l'eau dans ce solvant.

De même, le solvant affecte la cinétique enzymatique en modifiant la vitesse maximale  $V_m$  et la constante de Michaelis  $K_M$ . Aucune relation générale expliquant ce phénomène n'a été trouvée, et les résultats sont plutôt variables selon l'enzyme, le solvant et la quantité d'eau présente. Pour l' $\alpha$ -chymotrypsine, Reslow (1987) observe une augmentation de  $V_m$  et plus faiblement de  $K_M$  avec l'augmentation du  $\log(P)$  du solvant. Pour la lipase pancréatique de porc, Secundo (1992) trouve le contraire. Zaks (1988a) a montré que le rapport  $V_m/K_M$  pour la subtilisine et la chymotrypsine, catalysant la transestérification de l'ester éthylique de la N-acétyl-L-phénylalanine par le propanol, est dépendant de la nature hydrophobe du solvant. Il note que la chymotrypsine est plus sensible au changement de solvant.

La constante d'association enzyme-substrat de la première étape de la réaction catalytique et le turnover catalytique sont aussi dépendants du solvant. L'activité enzymatique de la subtilisine varie inversement avec la valeur de la constante d'association. Cette dernière diminue avec l'augmentation de  $\log(P)$  (Chatterjee 1992). L'étape limitante de la réaction est, par conséquent, contrôlée par le couple solvant-addition d'eau.

Le substrat et le solvant peuvent, enfin, entrer en compétition pour le site actif (Kasche 1991).

#### **A.6.4. Nouvelles propriétés catalytiques associées à la présence d'un solvant organique**

Une grande partie des nouvelles propriétés catalytiques est liée à la très faible quantité d'eau, plutôt qu'à la présence d'un solvant organique. L'augmentation de la stabilité thermique en est le parfait exemple. Il est connu et admis que la stabilité thermique d'une enzyme augmente avec l'hydrophobie du solvant. La stabilité de stockage de la chymotrypsine dans un solvant organique est un autre exemple intéressant. Ainsi, l'activité de cette enzyme est totale après 6 mois de stockage à 20°C dans l'octane anhydre, alors que sa demi-vie n'est que de quelques jours dans l'eau à la même température (Zaks 1988a).

Par contre, réaliser la catalyse enzymatique en milieu organique altère la spécificité de l'enzyme. Dans ce type de solvant, ceci est principalement dû à l'absence d'interactions hydrophobes (Tanford 1980, Klivanov 1989), principalement impliquées dans l'association



du substrat avec les hydrolases en milieu aqueux. Dans l'eau, l'hydrolyse d'esters de L-acides aminés-N acétylé par la chymotrypsine est 50 000 fois plus importante en passant de l'acide aminé phénylalanine hydrophobe à la sérine hydrophile. Dans l'octane, l'ester sérinique n'est que 3 fois plus réactif pour la réaction de transestérification (Zaks 1986). Avec l'ester de l'histidine, il y a même inversion de sélectivité par rapport à l'ester de la phénylalanine en passant de l'eau à l'octane. Des résultats similaires ont été obtenus avec la subtilisine et l'estérase de foie de porc. A l'aide de 20 solvants anhydres, Wescott (1993) démontre que la sélectivité de l'ester du dérivé sérinique par rapport au dérivé de la phénylalanine est proportionnelle à la différence des  $\log(P)$  des substrats dans le mélange solvant considéré-eau :

$$\frac{\left(\frac{V_m}{K_M}\right)_{Ser}}{\left(\frac{V_m}{K_M}\right)_{Phe}} = \alpha \cdot \left[ \log\left(\frac{P_{Ser}}{P_{Phe}}\right) \right] + \beta$$

Ainsi, la transestérification de l'ester de la sérine est favorisée dans les solvants allant du dichlorométhane à l'acétone, alors qu'elle est plus favorable à l'ester de la phénylalanine dans l'alcool tertio-butylque, l'alcool tertio-amylique et la ter-butyl amine.

De même, l'utilisation de milieux pauvres en eau permet d'obtenir directement les esters énantiomères à partir de mélanges racémiques d'alcools ou d'acides. Une étape est donc éliminée puisqu'en milieu aqueux il faut passer par une estérification chimique, puis une hydrolyse enzymatique. Ainsi, l'estérification de l'acide propanoïque  $\alpha$ -halogéné racémique par des alcools primaires, à l'aide de la lipase de *Candida rugosa*, donne l'ester (R) avec un excès énantiomérique (ee) de 96% (Figure A.6.4.a) (Klibanov 1986).

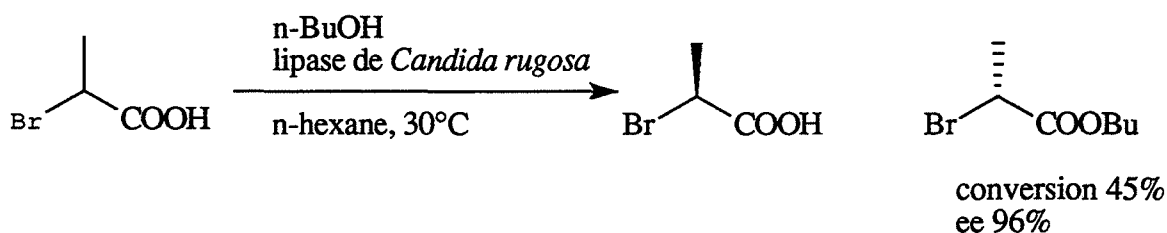
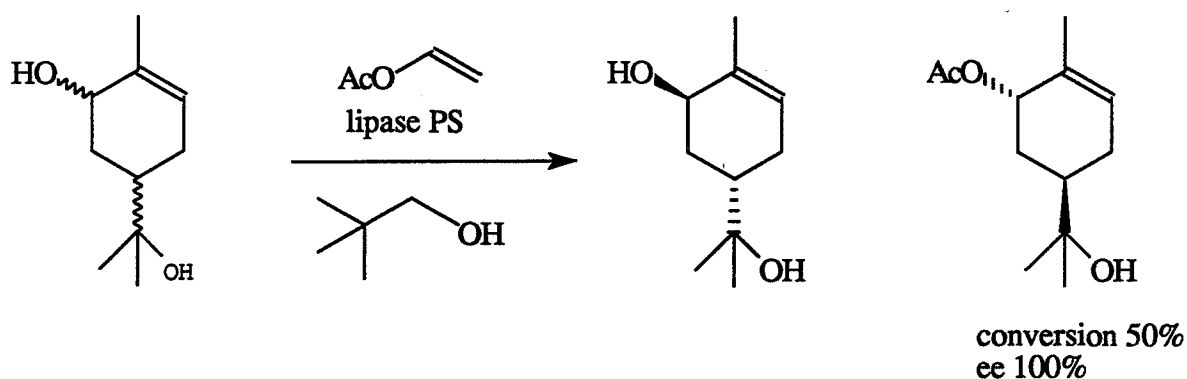


Figure A.6.4.a : Synthèse énantiomérique d'un ester de l'acide 2-bromo propanoïque.

Bovara (1991) montre l'influence de la nature du solvant sur la stéréosélectivité de la lipase de *Pseudomonas sp.* pour la résolution du trans-sobrerol racémique par transestérification avec l'acétate de vinyle. Dans l'alcool t-amylique, l'excès énantiomérique est très proche de 100% (Figure A.6.4.b). Il n'y a pas toutefois de relation simple entre stéréosélectivité et nature du solvant, et les résultats sont souvent contradictoires.



**Figure A.6.4.b** : Résolution du trans-sobrerol racémique par transestérification enzymatique.

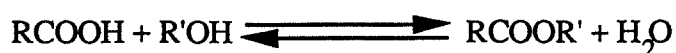
## A.7. LIPASES EN MILIEUX ORGANIQUES

De nombreux travaux ont déjà été réalisés avec les lipases. En effet, ce sont des modèles de choix. Leur utilisation en milieux organiques a ouvert l'accès à de nouvelles réactions impossibles dans l'eau.

### A.7.1. Réactions catalysées par les lipases en milieux organiques

Plusieurs réactions peuvent être distinguées. Il ne faut pas oublier qu'en présence d'une grande quantité d'eau, l'hydrolyse peut être favorisée. Toutefois, en ajoutant un autre nucléophile, alcool, amine ou ester, d'autres réactions peuvent avoir lieu : estérification, transestérification, alcoolyse, aminolyse, interestérification. Le substrat de départ est, soit un acide, soit un ester. Un bref rappel de ces réactions est présenté ci-après.

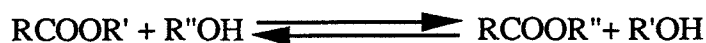
- L'estérification met en jeu un acide carboxylique et un alcool et donne un ester et de l'eau :



- La transestérification ou acidolyse permet un échange d'acyle entre un ester et un acide carboxylique :



- L'alcoolyse permet un échange de groupe alkoxy entre un ester et un alcool :



- L'aminolyse permet la synthèse d'amide à partir d'esters par une amine primaire ou secondaire :



A la place d'une amine, il est possible d'employer un thiol pour obtenir un thioester.

- L'interestérisation est une réaction d'échange de groupement acyle entre deux esters :



Enfin, il existe l'intraestérification (Yamane 1989, 1990) : ce terme désigne une estérification intramoléculaire. Le produit obtenu est un ester cyclique ou lactone.

En fonction du produit désiré et des substrats disponibles, il est donc possible d'utiliser l'une de ces réactions pouvant être catalysées par la même lipase. Contrairement à l'estérification, les autres réactions ne créent pas d'eau. Ceci peut permettre de maîtriser la quantité d'eau présente dans le système, qui a un rôle capital dans la catalyse (cf paragraphe A.5). Cependant, les substrats de départ sont la plupart du temps l'acide carboxylique et l'alcool.

### A.7.2. Mécanisme réactionnel d'estérification par catalyse enzymatique

Il s'avère que le site catalytique des lipases est le même en milieux organiques et en milieu aqueux. Ceci vient du fait que la structure de la lipase est similaire dans ces deux milieux. Le mécanisme de la réaction a déjà été décrit pour l'hydrolyse en milieu aqueux (cf paragraphe A.1.3). Il fait intervenir l'hydroxyle de la sérine, l'histidine et l'acide aspartique (pour la lipase de *Mucor miehei* par exemple) ou l'acide glutamique (pour la lipase de *Candida rugosa* par exemple) (Kazlauskas 1994). Pour l'estérification, le mécanisme est inverse. En particulier, le premier produit formé est l'eau. La réaction est schématisée dans la Figure A.7.2.a. Chaque étape est en fait un équilibre : la formation de l'ester RCOOR' sera favorisée s'il est extrait par le solvant organique.

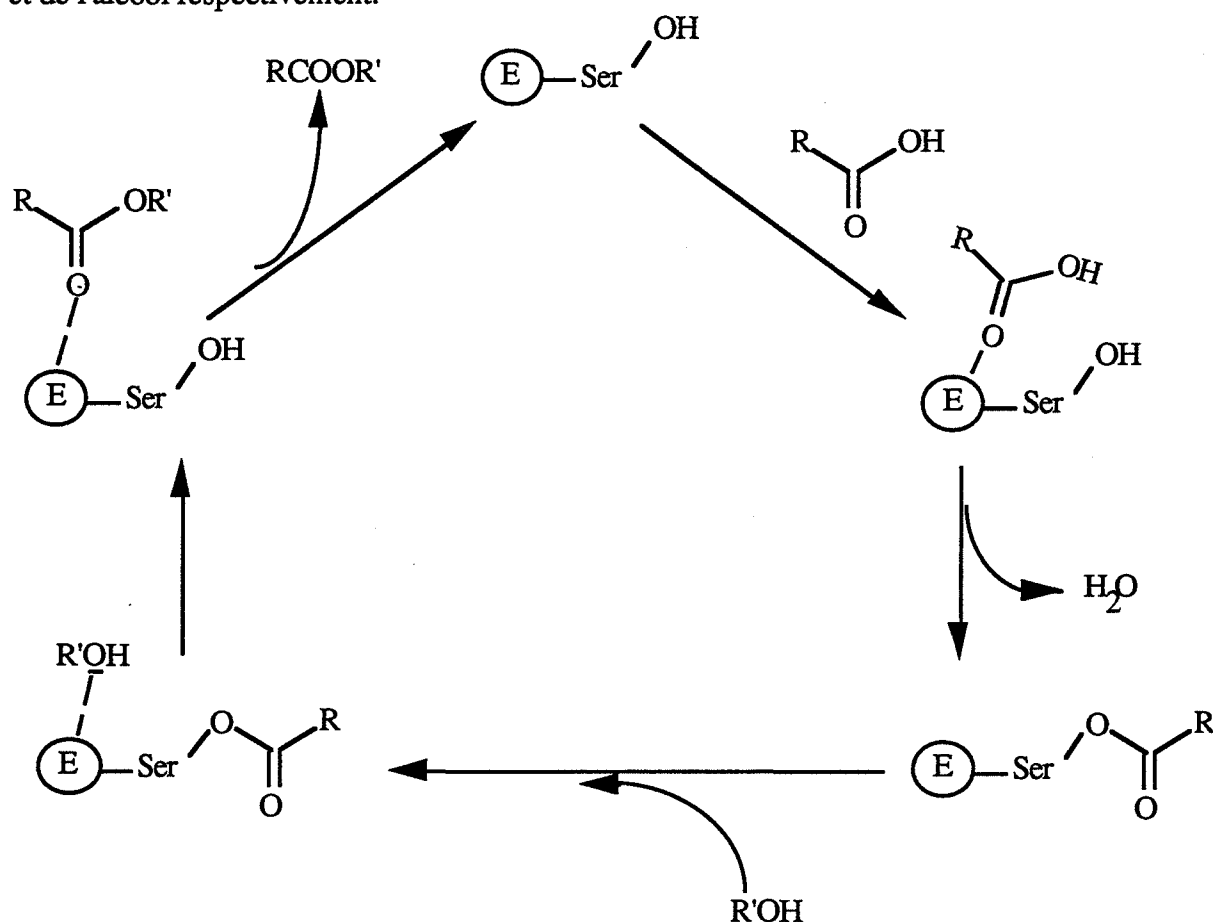
Cette réaction est un équilibre qui dépend de la concentration de chaque composé. Cet équilibre sera déplacé si l'un des substrats est en excès ou si l'un des produits est éliminé. La position de l'équilibre sera déterminée par la répartition de ces composés dans le système hétérogène.

La cinétique de l'estérification est fortement dépendante de la première étape de la réaction qui est la formation de l'acyl-enzyme.

Ce mécanisme, présenté sur la Figure A.7.2.a, est de type Bi-Bi Ping-Pong. Il est admis depuis longtemps en milieu aqueux, mais il a été mis en évidence récemment en milieux organiques (Chulalaksananukul 1992, Valivety 1993, Marty 1994, Rackels 1994). Celui-ci met en jeu deux substrats et deux produits (Bi-Bi) avec arrivées de substrats et départs de produits alternés (Ping-Pong). L'équation cinétique suivante est alors obtenue :

$$\frac{V_i}{V_m} = \frac{[Ac][Al]}{K_{M(Al)}[Ac] + K_{M(Ac)}[Al] + [Ac][Al]}$$

Avec  $V_i$  vitesse initiale de la réaction,  $V_m$  vitesse maximale,  $[Ac]$  et  $[Al]$  respectivement concentration en acide et alcool au départ,  $K_{M(Ac)}$  et  $K_{M(Al)}$  constante d'affinité de l'acide et de l'alcool respectivement.



**Figure A.7.2.a** : Schéma du mécanisme réactionnel de l'estérification catalysée par une lipase.

### A.7.3. Applications des lipases en milieu organique

Seules les applications les plus importantes seront détaillées. L'utilisation de ces biocatalyseurs en chimie fine pour la résolution d'acides, d'alcools ou d'esters, ou pour des réactions régio et énantiosélectives est très développée au niveau laboratoire.

#### A.7.3.1. Synthèse de polyesters

La synthèse de polyesters, résultat de la condensation de diols avec des diesters, peut être réalisée par les lipases. L'intérêt principal est la possibilité d'obtenir une polymérisation énantiosélective de monomères racémiques (Dordick 1992).

#### A.7.3.2. Modification de glycérides

La plus grande application des lipases, du moins en tonnage, est la modification des huiles et graisses. Par les méthodes chimiques, cette modification nécessite de hautes températures et pressions dégradant une partie du produit. La voie enzymatique permet de contourner les problèmes de coûts énergétiques et de qualité de produits, tout en apportant une régiosélectivité supérieure. Trois catégories de lipases peuvent être distinguées en fonction de leur spécificité pour les triglycérides. La première ne présente aucune spécificité vis-à-vis des groupes acyle et de leur position. La seconde est spécifique des positions 1,3 du glycérol. Enfin, la dernière est spécifique du groupement acyle et non de sa position.

Les lipases spécifiques des positions 1,3 permettent l'échange d'acide gras par acidolyse. Ces triglycérides modifiés ont des débouchés dans l'industrie oléochimique ou dans le domaine de la nutrition. L'aminolyse de triglycérides par l'ammoniac donne des amides d'acides gras, utilisés par exemple comme imperméabilisants ou additifs pour les lubrifiants. Les esters d'acides gras sont commercialisés dans les produits de beauté et savons sous le nom bioesters.

#### A.7.3.3. Acylation régiosélective de glycosides

L'emploi d'une lipase régiosélective permet d'obtenir des esters de sucres utilisés dans les détergents ménagers, les produits cosmétiques et comme agents dégraissants de surface. La lipase de *Candida antarctica* acyle régiosélectivement la position 6-O de l'éthyl glucose (Adelhorst 1990) et de l'octyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (De Goede 1994).

#### A.7.3.4. Synthèse d'esters présents dans les arômes

Les composés aromatiques n'ont aucune valeur nutritionnelle, ils apportent le goût et l'odeur aux aliments. Dans un souci de compenser les pertes de goût et d'odeur inhérentes à la fabrication industrielle de produits agroalimentaires, il est nécessaire d'ajouter des arômes naturels ou synthétiques. La part des arômes de nos jours représente 10 à 15% en poids et 25% en valeur de la totalité des additifs alimentaires. Le marché mondial est évalué à 2-3 milliards de dollars (Armstrong 1986), et l'accroissement annuel est voisin de 30%.

Ces valeurs importantes associées à un engouement des consommateurs sans cesse croissant pour des produits naturels ont permis, d'une part, d'établir la définition législative des termes arôme naturel et, d'autre part, de développer des accès non chimiques à ce type de composés.

Un arôme est dit naturel s'il répond à la définition américaine 21 CFR101.22.a.3 du Code des Régulations Fédérales. Celle-ci englobe les méthodes d'extraction, la fermentation, la synthèse par voie enzymatique et les méthodes physiques (chauffage, distillation) donnant les composés aromatiques à partir de précurseurs biologiques naturels.

Un arôme est rarement constitué d'un seul composé volatil. Il comprend généralement un mélange complexe de familles de molécules dans des proportions souvent délicates à reproduire car dépendantes de nombreux paramètres : nature de l'aliment, climat, composition des sols, ... (Armstrong 1986).

Les principales molécules peuvent être classées en plusieurs familles de composés : acides carboxyliques, cétones, aldéhydes, esters, lactones, terpènes et pyrazines (Armstrong 1986).

Deux voies d'obtention sont envisageables (Langrand 1990, Chulalaksanankul 1992) :

- l'arôme est directement accessible, soit par extraction de produits naturels, soit par fermentation à l'aide de microorganismes,
- l'arôme est recréé à partir de différentes molécules extraites ou synthétisées spécifiquement par voie chimique ou biochimique.

Actuellement, pour les arômes naturels, les industriels privilégient la première approche alors que ce sont des techniques chères donnant l'arôme souhaité avec de très faibles rendements car présent en quantité peu importante.

L'extraction, quant à elle, dépend d'autres facteurs : variations saisonnières, instabilité socio-économique, plantes en voie d'extinction.

Tous ces inconvénients tendent à limiter leurs débouchés industriels. C'est pourquoi les industriels sont intéressés par la synthèse des monocomposés. De plus en plus, la synthèse chimique est abandonnée pour des applications agroalimentaires car elle procure des molécules dites artificielles avec des rendements et puretés plus faibles. Les industriels délaissent cette voie au profit des réactions enzymatiques.

En mélangeant ces composés dans des proportions adéquates, l'aromaticien aboutit à un arôme proche de celui existant naturellement.

La famille des composés aromatiques la plus étudiée est certainement celle des esters (Welsh 1990). La catalyse par les lipases se prête bien à la synthèse de ces molécules. Actuellement, les travaux dans ce domaine représentent environ 40% de toutes les publications concernant la synthèse enzymatique en milieu organique (Faber 1993).

La nature de l'acyle et de l'alkoxyde est très variée. Les esters présents dans les arômes sont principalement de petits esters. Les acides sont généralement aliphatiques non ramifiés et vont de l'acide acétique (Che Omar 1988, Razafindralambo 1994, Perraud 1995) aux acides gras (Knez 1990, Habulin 1993). Les alkoxydes des esters proviennent de petits alcools, du méthanol (Perraud 1995) à l'hexanol (Manjon 1991), mais aussi des alcools terpéniques (Langrand 1990, Chulalaksananukul 1992, Fonteyn 1994).

Parmi les esters présents dans les arômes, il existe des esters avec la fonction acyle ou alkoxyde comportant un carbone asymétrique. Les alcools secondaires (Lutz 1992) et les acides  $\alpha$ -ramifiés (Engel 1992) sont les plus courants.

#### A.7.3.5. Esters difficiles à synthétiser par voie enzymatique

Malgré cette grande variété d'esters déjà synthétisés par voie enzymatique, de nombreux points sont encore insatisfaisants.

Les esters méthyliques posent de nombreux problèmes, car le méthanol est connu pour ses propriétés inhibitrices.

Peu d'enzymes sont spécifiques des acides  $\alpha$ -substitués. Les esters aliphatiques  $\alpha$ -substitués et les esters  $\alpha$ -benzéniques appartiennent ainsi à une catégorie d'esters très peu étudiée. Les quelques résultats sont souvent décevants. Ces acides semblent inhiber les enzymes (Takahashi 1984).

#### A.7.3.6. Esters de l'acide benzoïque

Peu de publications ont été rapportées sur des essais d'estérification de l'acide benzoïque par voie enzymatique. D'après Takahashi (1984), les acides  $\alpha$ -substitués, et en particulier l'acide benzoïque, semblent jouer le rôle d'inhibiteurs vis-à-vis de nombreuses lipases. Actuellement, deux équipes ont réussi à estérifier cet acide par voie enzymatique, mais leurs méthodes donnent de faibles rendements.

D'une part, la synthèse du benzoate de glycéryle, avec un rendement de 8,9% après 16 heures à 30°C, a été décrite par Tsujisaka (1977), en utilisant la lipase d'*Aspergillus niger*.

D'autres lipases provenant de *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* et *Penicillium cyclopium* ne donnent aucun résultat.

D'autre part, l'équipe de Kodera (1986) a envisagé d'employer des lipases immobilisées sur polyéthylène glycol (PEG) provenant de *Candida cylindracea* et *Pseudomonas fluorescens*. Seule la première permet la synthèse du benzoate de méthyle. Sur de petites quantités de substrats (60 mmol d'acide benzoïque pour 12 mmol de méthanol dans 0,3 ml de benzène et catalysées par 0,135 mg de PEG-lipase), Kodera obtient 3,6 mmol d'ester, soit 6% de rendement par rapport à l'acide introduit.

Le benzoate de méthyle est sans doute l'ester de l'acide benzoïque le plus demandé. Le principal utilisateur du benzoate de méthyle est l'industrie des parfums : les Etats-Unis produisent actuellement par voie chimique 6800 kg de benzoate de méthyle par an. Il est connu sous le nom d'essence de Niobe et est un ingrédient du parfum "peau d'Espagne". Le benzoate de méthyle est par ailleurs un solvant des acétates et nitrates de cellulose. Il sert enfin d'agent aromatisant synthétique dans l'industrie alimentaire (Etats-Unis - Code des Régulations Fédérales : 21 CFR 121.1164).

Le benzoate de méthyle se retrouve en proportions variables dans de nombreuses plantes, fleurs et fruits : fleurs de tubéreuses, clous de girofle, fleurs d'ilang-ilang, fleurs de jonquilles, framboises, cerises, taperebà (fruit amazonien donnant un jus doux amer pour glaces et liqueurs), papayes, kiwis,...(Kwei 1992).

Les autres benzoates, surtout d'éthyle et de n-propyle, sont également présents, mais en quantités plus faibles dans de nombreuses baies (Morton 1990).

L'industrie des jus et sirops de fruits, soucieuse d'améliorer ou d'accentuer l'arôme naturel fruité, est donc intéressée par les esters de l'acide benzoïque obtenus par catalyse enzymatique.





**CHAPITRE B**  
**MATERIELS ET METHODES**



## B.1. MATERIELS

### B.1.1. Enzymes

Les enzymes, la lipase de *Candida cylindracea*, appelée *rugosa* (activité comprise entre 2,3 et 3,1 U/mg selon le lot) et la lipase de *Rhizopus arrhizus* (activité 1,5 U/g), sont commercialisées par la société Fluka®. La Lipase 80 000 (de *Rhizopus arrhizus*) et l'Estérase 30 000 (de *Rhizomucor miehei*) nous ont été généreusement fournies par la société Gist-Brocades®.

Les activités pour chaque enzyme correspondent à l'activité hydrolytique donnée par le fournisseur. Pour Fluka®, 1 U est égale à la quantité d'enzyme qui libère 1 µmol d'acide oléique par min à pH 8 (37°C et comme substrat l'huile d'olive pour la lipase de *Candida rugosa*, 40°C et la trioléine pour la lipase de *Rhizopus arrhizus*). Pour Gist-Brocades®, les chiffres de la dénomination commerciale des enzymes correspondent approximativement à l'activité hydrolytique de l'enzyme en nombres d'unités par gramme. 1 U est égale à la quantité d'enzyme qui libère 1 µmol d'acide butyrique par min, à pH 7,5 et 40°C à partir de la tributyrine.

La lipase de *Candida rugosa* (CRL) est une poudre légèrement marron, contenant environ 40% de lactose. Son taux d'humidité est estimé à  $3,1 \pm 0,1\%$  (g/g). Sa teneur en protéines est estimée à 15% (g/g).

L'Estérase 30 000 (MME) est une poudre marron obtenue par atomisation. Son taux d'humidité est  $3,5 \pm 0,1\%$  (g/g). Sa teneur en protéines est voisine de 3% (g/g).

### B.1.2. Produits

Le 1-butanol, le 2-butanol, l'hexane, le toluène et l'éther diéthylique proviennent de la société Prolabo®. L'hexane et le toluène sont de qualité Rectapur. Les alcools et l'éther diéthylique sont de qualité analytique. L'acétone, le méthanol, l'éthanol et le n-propanol proviennent de la société Carlo Erba®. Ils sont tous de qualité analytique. L'acide benzoïque (BzOH), le benzoate de méthyle (BzOMe), la célite 535, le 2(S)- et le 2(R)-butanol sont des produits Fluka®. Enfin, le benzoate de 1-butyle (BzOBu) est un produit de la société Aldrich®.

## B.2. CONDITIONS DE REACTION

Les réactions d'estérification ont lieu dans un flacon de 40 ml fermé par un bouchon muni d'un septum téflonné. Ce tube est agité sur une table orbitale (Braün®) sous une hotte thermorégulée (de marque Braün®). La vitesse d'agitation et la température sont

respectivement fixées à 220 tr/min et 37°C pour la mise en place du système catalytique. Ces conditions seront ensuite optimisées. La concentration en réactifs, la teneur en eau et en enzyme sont calculées à partir du volume total de réaction, fixé à 20 ml. Les conditions sont rappelées pour chaque figure.

Jusqu'au paragraphe C.3.2., le temps zéro, correspondant à ces essais, est le moment où est introduit l'enzyme dans le mélange de BzOH, MeOH et de solvants.

A partir du paragraphe C.3.2., l'enzyme, le BzOH, dissous dans le milieu organique et éventuellement de l'eau, soit directement additionnée dans le flacon, soit apportée par pré-équilibre, sont mélangés et mis à incuber sur la table d'agitation. Le temps zéro correspond à l'introduction de l'alcool dans le flacon.

### **B.3. METHODES ANALYTIQUES**

#### **B.3.1. Chromatographie en phase gazeuse**

Le BzOH et les esters obtenus ont été dosés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'appareil utilisé est un chromatographe Hewlett Packard® HP 5890, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Le volume d'échantillon injecté est de 2 µl. La séparation a lieu dans une colonne capillaire Permaabond SE 52 de 25 m de longueur et un diamètre interne de 0,25 mm. Le gaz vecteur est l'hélium à un débit de 0,74 ml/min. Les températures de l'injecteur, du four et du détecteur sont respectivement 250, 150 et 250°C.

L'analyse des pics est effectuée à l'aide du système d'acquisition de données et d'intégration Hewlett Packard® HP 3365 Series II. Un étalonnage externe est utilisé pour quantifier chaque pic.

Les taux de conversion sont toujours calculés par rapport à l'acide benzoïque introduit initialement.

Le dosage du 1-BuOH dans le toluène et dans l'hexane, pour déterminer le coefficient de partage, a été réalisé avec le même matériel en modifiant les températures de l'injecteur et du four, respectivement 150 et 50°C.

Etant sans standard pour les benzoates d'éthyle et de propyle, les taux de conversion, obtenus pour la Figure D.a, sont les taux de conversion surfaciques. Ils correspondent au rapport de la surface du pic d'ester sur la somme des surfaces des pics de l'ester et de l'acide benzoïque.

### B.3.2. Dosage de l'eau par la méthode de Karl-Fischer

La quantité d'eau dissoute dans le milieu organique est déterminée par la méthode de Karl-Fischer à l'aide du titrateur VIT 90 Titralab de Radiometer muni de l'autoburette ABU 91. L'agent titrant Hydranal titrant 2 et le solvant Hydranal Arbeitsmedium proviennent de la société Riedel de Haën®. Le titrant est étalonné à chaque nouvelle utilisation par un standard Hydranal tartrate de sodium dihydraté (Riedel de Haën®).

### B.4. DETERMINATION DE L'HUMIDITE DE LA POUDRE ENZYMATIQUE

L'humidité de la poudre commerciale est déterminée par séchage de 3 échantillons de 200 mg environ d'enzyme pesée exactement ( $m_1$ ) à 100°C jusqu'à obtenir une masse sèche constante ( $m_2$ ). L'humidité de la poudre (%) est alors calculée par la formule suivante :

$$\text{Humidité} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100$$

L'humidité moyenne est la moyenne sur les 3 échantillons.

### B.5. DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique de Bio Rad® protein assay. L'enzyme est dissoute dans un tampon phosphate 100 mM, pH 7. Les impuretés insolubles sont éliminées par centrifugation 15 min à 3000 tr/min (centrifugeuse Jouan CR 411®).

La courbe d'étalonnage est réalisée avec 40 µl de standard albumine de sérum bovin, dans une gamme de concentrations comprises entre 0,33 et 1,33 mg/ml, en présence de 2 ml d'une solution de Bleu de Coomassie diluée 5 fois. Simultanément, un mélange comprenant 40 µl de surnageant de centrifugation de l'enzyme et 2 ml de solution de Bleu de Coomassie diluée est également préparé.

L'analyse a lieu après 5 min d'incubation à température ambiante, en mesurant l'absorbance des solutions étalons et de l'échantillon à analyser au spectrophotomètre UV-visible Uvikon 860 (Kontron Instruments®) à 595 nm.

La concentration obtenue est rapportée au volume de surnageant, puis à la masse d'enzyme dissoute.

## **B.6. DEFINITIONS**

### **B.6.1. Enzyme lyophilisée**

L'enzyme est solubilisée dans 10 ml de tampon phosphate de pH et de concentration fixés. La solution enzymatique est alors congelée à -18°C, et lyophilisée (Lyophilisateur HETOSICC de Heto Lab Equipment®). La poudre obtenue est appelée enzyme lyophilisée.

### **B.6.2. Enzyme séchée**

L'enzyme brute est congelée à -18°C, puis introduite dans le lyophilisateur pour la sécher. La poudre obtenue est appelée enzyme brute séchée.

### **B.6.3. Enzyme purifiée**

Cette purification a été décrite par Monot (1993). L'enzyme est solubilisée dans de l'eau ultrapure pour obtenir une solution enzymatique à 5 g/l. Cette solution est centrifugée 15 min à 3000 tr/min et 4°C (centrifugeuse Jouan CR 411). Le surnageant est alors congelé et lyophilisé (Lyophilisateur HETOSICC de Heto Lab Equipment®). La poudre obtenue est appelée enzyme purifiée.

### **B.6.4. Enzyme incubée en présence de toluène**

L'enzyme (200 mg) est incubée pendant une heure à 37°C sous agitation (220 tr/min) en présence de 7 ml de toluène saturé en eau. Ensuite, le toluène est éliminé par pipetage de la solution décantée. L'enzyme obtenue, appelée enzyme incubée dans le paragraphe C.3.2., est alors utilisée telle quelle.

## **B.7. REUTILISATION DE L'ENZYME**

Après la fin de la réaction, le milieu organique est éliminé par pipetage. L'enzyme est lavée par 3x10 ml d'acétone préalablement séchée sur tamis moléculaire, puis séchée au lyophilisateur pendant 48 h.

L'enzyme sèche obtenue est alors réutilisée telle quelle.

## B.8. PHASE D'INCUBATION

La phase d'incubation consiste à mettre l'enzyme en contact avec le mélange comprenant l'acide benzoïque, les solvants organiques et l'eau, à la température et l'agitation définies lors de la mise en place du système catalytique. Après différents temps d'incubation, le méthanol est ajouté pour démarrer la réaction. L'évolution des taux de conversion est alors suivie.

## B.9. DETERMINATION DES COEFFICIENTS DE PARTAGE

Le coefficient de partage du 1-BuOH dans les systèmes toluène/eau, hexane/eau et mélange équivolumique hexane-toluène/eau a été déterminé au laboratoire. 200 µl de 1-BuOH sont introduits dans 10 ml de solvant ou de mélange organique et dosés par CPG (concentration  $C_1$ ). 10 ml d'eau ultrapure sont alors ajoutés. Le mélange est agité plusieurs heures et décanté. Le 1-BuOH restant dans la phase organique est alors à nouveau dosé par CPG (concentration  $C_2$ ).

Le coefficient de partage  $P$  est le rapport de la concentration en 1-BuOH dans la phase organique sur la concentration du 1-BuOH dans la phase aqueuse :  $P = \frac{C_2}{C_1 - C_2}$ .

De la même manière, le coefficient de partage de BzOH a été déterminé dans les systèmes toluène/eau et mélange équivolumique hexane-toluène/eau en introduisant 60 mg de BzOH et en dosant le BzOH contenu dans la phase organique.

## B.10. SYNTHÈSE CHIMIQUE DU BENZOATE DE 2-BUTYLE

Le benzoate de 2-butyle n'est pas un composé commercialisé. Il est nécessaire de le synthétiser par voie chimique pour étalonner la chromatographie en phase gazeuse. Le benzoate de 2-butyle a été obtenu en s'inspirant du mode opératoire donnant le benzoate de méthyle décrit par Chavanne et coll. (1986). Le mode opératoire utilisé est le suivant :

- Introduire 20 g de BzOH et 100 ml de 2-BuOH dans un ballon tricol de 250 ml.
- Couler lentement 6 ml d'acide sulfurique concentré environ 18 M en agitant la solution avec un barreau magnétique.
- Chauffer alors à reflux pendant 2 h tout en agitant.
- Refroidir la solution et la couler sur 50 ml d'eau froide dans une ampoule à décanter.
- Ajouter 100 ml d'éther diéthylique et agiter.
- Séparer la phase aqueuse, et laver la phase organique avec 50 ml d'eau, puis 50 ml d'une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  à 5%, et 50 ml d'une solution saturée en NaCl.
- Sécher la phase organique sur 1 g de sulfate de magnésium sec, distiller l'éther diéthylique et le 2-butanol et rectifier le benzoate de 2-butyle à pression réduite.



## **B.11. PRE-EQUILIBRAGE A UNE ACTIVITE EN EAU DONNEE**

### **B.11.1. Enzyme**

Une quantité d'enzyme, correspondant à la teneur en enzyme sèche dans le réacteur, est pesée dans le flacon-réacteur et introduite dans un dessiccateur comportant une solution saturée en sels d'activité en eau connue. L'activité en eau est le rapport entre la pression partielle en eau au-dessus de la solution saturée en sels et celle au-dessus de l'eau pure dans les mêmes conditions de température et de pression. C'est donc une valeur comprise entre 0 et 1.

L'adsorption d'eau est stabilisée après 48 h, indépendamment de la quantité d'enzyme introduite et de l'activité en eau de la solution saturée en sels. Les activités en eau des solutions saturées en sels utilisées sont 0,53 ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ), 0,65 ( $\text{NaNO}_2$ ), 0,75 ( $\text{NaCl}$ ), 0,81 ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) et 0,93 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). La quantité d'eau adsorbée, appelée eau adsorbée, est déterminée en pesant la poudre enzymatique après pré-équilibre.

### **B.11.2. Solvants pré-équilibrés**

Les solvants organiques et les différents isomères du butanol sont pré-équilibrés à une activité en eau de 0,65 en les mettant en contact direct pendant 24 h minimum avec une solution saturée de  $\text{NaNO}_2$ . Ils sont alors prélevés tels quels dans les flacons de pré-équilibre.

## **B.12. METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES**

La méthode des plans d'expériences est une méthodologie expérimentale qui consiste à minimiser le nombre d'expériences nécessaires pour étudier, simultanément, l'impact de plusieurs facteurs sur plusieurs grandeurs d'intérêt, appelées réponses (Goupy 1988). Contrairement aux méthodologies classiques, à chaque expérience, les valeurs de tous les facteurs, correspondant aux bornes fixées au départ de l'étude, varient selon un plan raisonné. De ce fait, les plans d'expériences apportent de nombreux avantages telles que la diminution du nombre d'expériences ou essais, l'augmentation du nombre de facteurs étudiés, la détection d'interactions possibles entre facteurs, l'optimisation et la modélisation des résultats, et la détection d'optimaux dans la zone délimitée par les bornes de chaque facteur.

Les principales applications des plans d'expériences sont la recherche et l'évaluation des facteurs influant sur les réponses étudiées, en un nombre minimum d'essais.

La réponse étudiée est donc fonction de plusieurs facteurs, d'échelle et d'unité différentes. Pour évaluer et comparer l'influence de chaque facteur, il convient donc de travailler en variables centrées réduites, appelées niveaux, ce qui ramène les bornes inférieure et supérieure respectivement à des valeurs, appelées niveaux, -1 et +1, par le calcul suivant :

$$x(i)j = 2(U(i)j - U(o)j)/\Delta Uj$$

avec  $x(i)j$  variable centrée réduite du facteur  $j$  pour l'essai  $i$  (niveau -1 ou +1),

$U(i)j$  valeur naturelle du facteur  $j$  pour l'essai  $i$  (borne inférieure ou supérieure),

$U(o)j$  valeur naturelle du facteur  $j$  au centre du domaine, soit la moyenne entre les bornes inférieure et supérieure du facteur  $j$ ,

$\Delta Uj$  différence entre les valeurs naturelles des bornes supérieure et inférieure du facteur  $j$ .

La réponse  $Y$  étudiée est reliée aux niveaux de chaque facteur par le modèle mathématique suivant :

$$y_j = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i \cdot x(j)_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{k=i+1}^n b_{ik} \cdot x(j)_i \cdot x(j)_k$$

(modèle avec interaction entre 2 facteurs)

avec  $y_j$  réponse pour l'essai  $j$ ,  $b_0$  moyenne des réponses,  $b_i$  et  $b_{ik}$  coefficients du modèle à estimer,  $x(j)_i$  et  $x(j)_k$  niveaux des facteurs  $i$  et  $k$  pour l'essai  $j$ ,  $n$  nombre de facteurs.

### B.12.1. Plan factoriel complet

Il consiste à effectuer, pour  $k$  facteurs,  $2^k$  essais suivant une matrice d'expériences donnée. Par exemple, pour 3 facteurs, la matrice comporte  $2^3$  essais (Tableau B.12.1, cadre en gras). Cette matrice permet de déterminer la matrice des effets (Tableau B.12.1). La colonne de l'interaction  $ij$  est calculée à partir de la matrice d'expériences en multipliant les éléments des colonnes des facteurs  $i$  et  $j$ , soit la formule suivante :  $x_{ij} = x_i \cdot x_j$ . Par exemple,  $x_{12}$  pour l'essai 1 est égale à  $x_1 \cdot x_2$  pour l'essai 1 soit (+1) ((-1).(-1)).

Le calcul des coefficients  $b_a$  est possible à l'aide de la matrice des effets :

$$b_a = \frac{\sum_{i=1}^n x(i)_a y_i}{n}$$

avec  $x(i)_a$  valeur centrée réduite du facteur (ou de l'interaction)  $a$  pour l'essai  $i$ ,  $y_i$  réponse de l'essai  $i$ ,  $n$  nombre d'essais.

Essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3	Réponse	Moyenne	Interaction 12	Interaction 13	Interaction 23	Interaction 123
1	-1	-1	-1	y1	+1	+1	+1	+1	-1
2	+1	-1	-1	y2	+1	-1	-1	+1	+1
3	-1	+1	-1	y3	+1	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	y4	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	y5	+1	+1	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1	y6	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	y7	+1	-1	-1	+1	-1
8	+1	+1	+1	y8	+1	+1	+1	+1	+1
diviseur	8	8	8		8	8	8	8	8
Effet	b1	b2	b3		b0	b12	b13	b23	b123

**Tableau B.12.1** : Exemple de matrice d'expériences  $2^3$  en variables codées et matrices des effets.

Le plan factoriel complet permet de modéliser complètement la réponse en estimant, en plus des effets directs de tous les facteurs, toutes les interactions possibles entre facteurs. Ceci se traduit par un nombre important d'expériences à réaliser. De même, ce plan factoriel suppose une variation linéaire de la réponse en ne modifiant qu'un facteur. Il est nécessaire de valider cette hypothèse en réalisant un essai au centre du domaine, dont la réponse sera comparée à  $b_0$ , la valeur moyenne calculée. L'écart entre ces deux valeurs, appelé biais, permet d'une part, d'estimer la courbure au centre du domaine, et d'autre part, s'il est faible, de valider le modèle.

### B.12.2. Plans factoriels fractionnaires

Les plans factoriels fractionnaires permettent de diminuer le nombre d'essais à réaliser, en considérant que certaines interactions entre facteurs sont négligeables. Par conséquent, en faisant cette hypothèse, le nombre d'essais à réaliser n'est que de  $2^{n-k}$  (avec  $n$  nombre de facteurs,  $k$  nombre d'interactions estimées négligeables).

En reprenant l'exemple précédent et en supposant que l'interaction 12 est négligeable, seuls  $2^{3-1}$  essais sont nécessaires (Tableau B.12.2). Ils correspondent aux essais 5, 2, 3 et 8 du plan factoriel complet (Tableau B.12.1). En effet, ce sont les essais pour lesquels les variables centrées réduites sont alors identiques pour le facteur 3 et l'interaction 12 (cf Tableau B.12.1).

Cette simplification aboutit à des alias, c'est-à-dire à un mélange des effets purs et des interactions. Donc, ce plan ne peut être utilisé que dans la mesure où les interactions sont très faibles devant les effets directs des facteurs, sinon, l'interprétation est très délicate. Pour faciliter l'interprétation, il faut apporter des hypothèses supplémentaires :

- les interactions entre 3 facteurs et plus sont considérées comme négligeables,
- si une aliase est nulle, alors les effets directs et interactions sont tous nuls (ceci est valable dans la plupart des cas),
- si deux effets sont faibles, leur interaction est négligeable,
- si deux effets sont forts, alors leur interaction doit être étudiée avec précaution.

Essai	Facteur 1	Facteur 2	Facteur 3 (interaction 12)	Moyenne	Réponses
5	-1	-1	+1	+1	y5
2	+1	-1	-1	+1	y2
3	-1	+1	-1	+1	y3
8	+1	+1	+1	+1	y8
Diviseur	4	4	4	4	
Aliases	$l_1 = b_1 + b_{23}$	$l_2 = b_2 + b_{13}$	$l_3 = b_3 + b_{12}$	$l_0 = b_0 + b_{123}$	

**Tableau B.12.2** : Matrices d'expériences et des effets d'un plan factoriel fractionnaire  $2^{3-1}$ .

Il est possible de rajouter, par la suite, aux plans fractionnaires les essais nécessaires pour obtenir un plan factoriel complet. Avec l'exemple choisi, il suffit de rajouter les essais 1, 4, 6 et 7, pour obtenir le plan complet  $2^3$ . C'est un avantage non-négligeable dans la mesure où les essais déjà réalisés peuvent être réutilisés si d'autres informations s'avèrent nécessaires, en particulier, si certaines interactions, *a posteriori*, ne sont pas négligeables.

## B.13. METHODES MATHEMATIQUES

### B.13.1. Logiciel NEMROD® pour les plans d'expériences

C'est un logiciel développé à l'Université d'Aix-Marseille, par D. Mathieu et R. Phan Tan Luu, qui permet de créer des plans d'expériences, calculer les effets et estimer la validité du modèle choisi.

### **B.13.2. Calcul des paramètres cinétiques**

La détermination des paramètres cinétiques par interpolations a été réalisée à l'aide du logiciel Kaleidagraph®.

**CHAPITRE C**

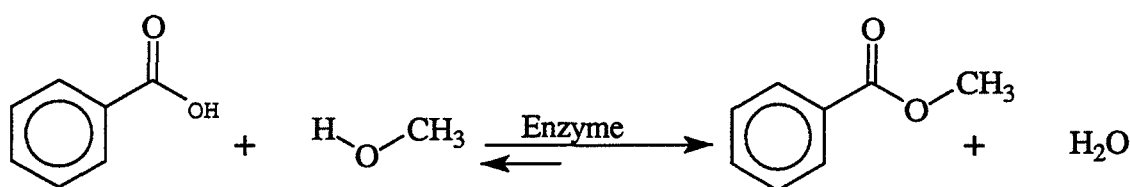
**LE BENZOATE DE METHYLE**



## INTRODUCTION

Les travaux présentés ci-dessous développent la synthèse du benzoate de méthyle par voie enzymatique. Dans un premier temps, l'objectif principal est la recherche des conditions favorables pour obtenir cet ester avec un taux de conversion et un temps de réaction acceptables. Dans un second temps, plusieurs facteurs influençant la réaction seront étudiés dans un but d'optimiser la catalyse et de comprendre le fonctionnement d'une enzyme en milieu microaqueux.

Dans cette partie, le benzoate de méthyle (BzOMe) sera biosynthétisé par estérification de l'acide benzoïque (BzOH) par le méthanol (MeOH). La réaction étudiée est la suivante :



### C.1. MISE EN PLACE DU SYSTEME CATALYTIQUE

#### C.1.1. Milieu de réaction

Avant d'entreprendre l'étude, il a fallu trouver un milieu de travail permettant la biosynthèse du benzoate de méthyle. L'acide benzoïque se présente sous forme de cristaux blancs alors que les acides aliphatiques sont généralement des liquides. Il est soluble dans très peu de solvants organiques. 1 g d'acide benzoïque est soluble dans 4,5 ml de chloroforme, 3 ml d'éther diéthylique, 2,3 ml d'éthanol, ou 10 ml de benzène (the Merck Index 1989).

L'hexane, solvant le plus souvent employé pour la catalyse en milieu microaqueux, ne permet pas de solubiliser l'acide benzoïque trop polaire. Il a fallu donc ajouter un cosolvant faisant partie de la liste ci-dessus.

L'éther diéthylique a d'abord été envisagé car il avait été utilisé par Langrand (1990). Cependant, après l'ajout de la lipase, l'acide benzoïque recristallise. Ce phénomène a lieu dans des milieux comportant de l'hexane et différentes proportions d'éther diéthylique allant de 10 à 50% (v/v).

De même, le chloroforme ne peut être utilisé car la recristallisation se produit quand la lipase est ajoutée.

Les alcools pouvant participer à la réaction ne sont pas des cosolvants envisageables.



Le benzène, malgré une solubilité faible, semble le seul cosolvant utilisable. Néanmoins, sa trop forte toxicité peut freiner le développement du procédé. Le toluène, un homologue moins toxique mais aux propriétés voisines, peut remédier à cet inconvénient.

Par conséquent, un milieu binaire totalement miscible hexane/toluène a été choisi pour la suite des travaux.

### C.1.2. Criblage enzymatique

Le choix des triacylglycérol hydrolases pour le criblage a été réalisé en fonction des données bibliographiques. Les enzymes retenues - lipase de *Rhizopus arrhizus*, Lipase 80 000 de *Rhizopus arrhizus*, Estérase 30 000 de *Mucor miehei*, lipase de *Candida rugosa* - sont en fait des biocatalyseurs peu spécifiques, utilisés couramment dans la littérature. Elles ont notamment l'avantage d'être commercialisées et d'être peu chères.

Les résultats du criblage sont réunis dans le Tableau C.1.

Pour simplifier les notations, la lipase de *Candida rugosa* et l'Estérase 30 000 de *Mucor miehei* seront appelées respectivement CRL et MME.

Enzyme	Estérification	Taux de conversion (%)
Lipase 80 000	non	
MME	oui	Après 18 j : 10,2%
lipase de <i>Rhizopus arrhizus</i>	non	
CRL	oui	Après 12 j : 8,3%

**Tableau C.1** : Criblage enzymatique, synthèse du benzoate de méthyle.

*Enzyme 5g/l, [BzOH] 100 mM, [MeOH]125 mM, hexane/toluène secs 50/50.*

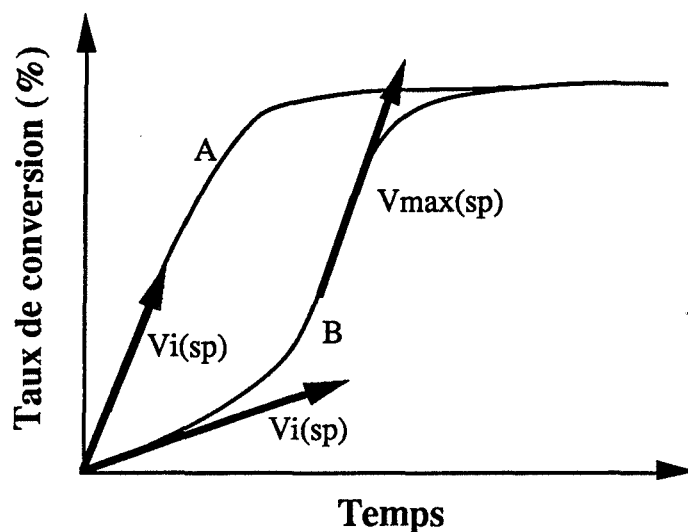
La Lipase 80 000 et la lipase de *Rhizopus arrhizus*, dans ces conditions opératoires, ne donnent pas l'ester souhaité. Le criblage avec d'autres lipases n'a pas été envisagé car les premiers résultats obtenus avec la MME et la CRL sont encourageants. Seules la MME et la CRL seront par conséquent utilisées par la suite.

### C.1.3. Notations employées

Nous emploierons plusieurs notations qu'il faut définir au début pour une meilleure compréhension des résultats. Ainsi, la vitesse initiale spécifique  $V_i(sp)$  correspond à la vitesse initiale  $V_i$  rapportée à la quantité d'enzyme (Figure C.1.3.a).

Lorsque la cinétique est autocatalytique, une vitesse maximale spécifique  $V_{max}(sp)$  sera introduite. Elle représente la vitesse maximale observée au cours de la réaction par

gramme d'enzyme.  $V_{\max}(sp)$  ne doit pas être confondue avec  $V_m$ , vitesse initiale maximale. Cette dernière est la constante cinétique indépendante des concentrations en substrats et intervenant dans l'équation de Michaelis et Menten.



**Figure C.1.3.a :** Représentation des différentes notations employées.

*Courbe A : courbe non autocatalytique, courbe B : courbe autocatalytique.*

Le taux de conversion est calculé par rapport à la quantité d'acide benzoïque introduite initialement.

## C.2. UTILISATION DE L'ESTERASE 30 000 (MME)

Cette enzyme est de loin la moins chère sur le marché. C'est pourquoi les premiers essais ont été entrepris avec ce catalyseur. La MME est une poudre marron comportant de nombreuses impuretés. La teneur en protéines est voisine de 3%. Son taux d'humidité est de  $3,5 \pm 0,1\%$ .

### C.2.1. Essais en solvants séchés sur tamis moléculaire 3 Å

Pour des considérations thermodynamiques, de nombreuses publications préconisent l'emploi de solvants secs (Carta 1992).

Etant donné le faible nombre d'analyses réalisé, nous préférons présenter les résultats sous forme de tableau. Le Tableau C.2.1 résume les résultats obtenus dans un mélange sec équimolaire hexane/toluène.

Essais	[BzOH] (mM)	[MeOH] (mM)	Teneur en MME (g/l)	Temps de réaction	Taux de conversion (%)
1	200	250	5	8 j	2,9
				18 j	10,2*
2	200	250	25	1,3 j	5,7
				5 j	23,5*
3	100	125	12,5	2 j	8,4
				4 j	22,6
				10 j	41,5*

**Tableau C.2.1** : Bioestérification en milieu séché équivolumique hexane/toluène.

(\* Taux de conversion maximaux obtenus)

Trois commentaires peuvent être faits à partir de ces résultats :

- la vitesse d'estérification et le taux de conversion sont dépendants de la quantité de MME (essais 1 et 2). La vitesse de réaction et le taux de conversion final sont supérieurs pour de fortes teneurs en MME,

- la dilution du milieu réactionnel (essais 2 et 3) modifie très peu la vitesse de réaction spécifique, mais le taux de conversion final est multiplié par deux après 10 jours de réaction (il faut tout de même signaler que la quantité de BzOMe produite est cependant voisine puisque la concentration en BzOH est divisée par deux),

- la formation de l'ester est très lente et les taux de conversion obtenus, même s'ils sont supérieurs aux données publiées, ne sont pas satisfaisants. Par ailleurs, quelques cristaux apparaissent rapidement après l'ajout de la MME dans le réacteur. Les taux de conversion du Tableau C.2.1 doivent, par conséquent, être revus à la baisse. Cette recristallisation, qui avait déjà été constatée lors de la recherche du solvant et du criblage enzymatique, peut être expliquée par plusieurs hypothèses. Après l'ajout de la MME, trois équilibres sont déplacés :

- répartition des substrats entre la phase organique et la pellicule d'eau autour de l'enzyme (en particulier, le méthanol est totalement soluble dans les deux phases liquides)
- répartition de l'eau apportée par la poudre catalytique entre la MME et le milieu réactionnel préalablement séché
- solubilisation d'une fraction du solvant dans la pellicule d'eau entourant l'enzyme.

La solubilité de l'acide benzoïque dans le milieu hexane/toluène dépend également des concentrations en méthanol et en eau dans ce mélange. Pour éviter la recristallisation, la saturation en eau du toluène, solvant le moins hydrophobe, a été envisagée. La cristallisation, dans ces conditions, ne s'est plus reproduite.

### C.2.2. Essais avec le toluène saturé en eau

Les résultats, avec le toluène saturé en eau, sont regroupés dans le Tableau C.2.2.

Essais	Hexane/toluène (v/v)	Teneur en MME (g/l)	Temps de réaction (j)	Taux de conversion (%)
4	50/50	12,5	2	15,2
			3	35,6
			13	40,5*
5	65/35	12,5	1	1,8
			2	2,1*
6	50/50	25	1	10,3
			4	38,4
			8	69*
7	50/50	25 réutilisée de l'essai 6	1	6,9
			3	16,5
			6	39,9
			7	46,2*
8	50/50	25 purifiée	1	5,1
			5	26,9
			8	42,4*

**Tableau C.2.2 :** Essais avec du toluène saturé en eau en milieu hexane/toluène.

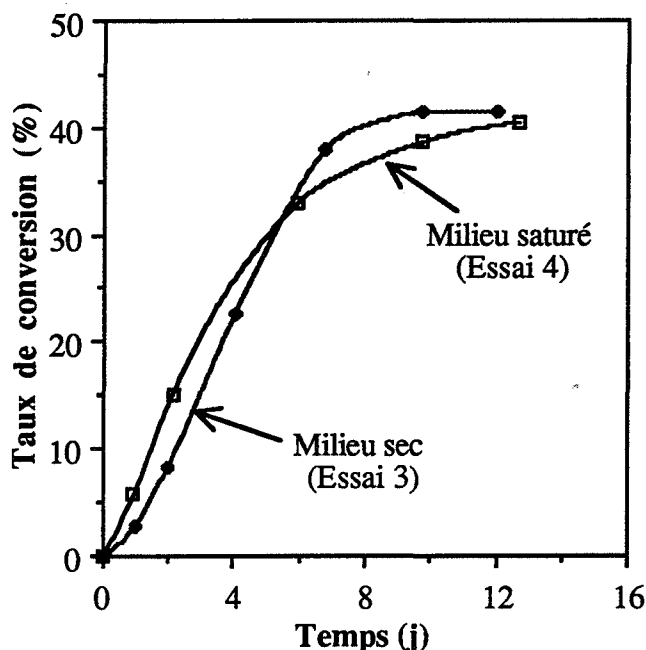
(\*Taux de conversion maximaux obtenus)  $[BzOH]$  100 mM,  $[MeOH]$  125 mM, hexane sec.

Les notes en gras indiquent la modification par rapport à l'essai 4.

En comparant les essais 3 et 4 (Tableaux C.2.1 et C.2.2), la saturation du toluène en eau aboutit à une augmentation de la vitesse initiale de réaction sans modifier de façon significative le taux de conversion final. L'eau apportée par le toluène saturé en eau active ou, du moins, empêche la désactivation de la MME en évitant la désorption de l'eau liée à l'enzyme par le toluène (modification de la répartition de l'eau dans le milieu).

Par ailleurs, cette quantité d'eau n'est pas suffisamment élevée pour déplacer l'équilibre dans le sens hydrolyse.

La différence de cinétique entre milieu sec et milieu saturé en eau est bien visible sur la Figure C.2.2.a.



**Figure C.2.2.a :** Différence de cinétique entre milieux sec et saturé en eau.  
[BzOH]100 mM, [MeOH]125 mM, MME 12,5 g/l, hexane/toluène 50/50.

Avec du toluène sec, la courbe est de type sigmoïdal. Au début, la réaction est lente : l'eau formée hydrate la poudre catalytique inactive. L'estérification est de type autocatalytique pendant environ les 2 premiers jours. Puis la vitesse devient maximale : toute la MME a atteint un état d'hydratation optimal. L'estérification, enfin, ralentit : un plateau est atteint après 7 j de réaction.

La saturation en eau permet d'éluder ce problème : l'aspect autocatalytique est peu perceptible. Mais, après les 2 premiers jours pendant lesquels l'eau apportée par le toluène autorise une plus forte activité de la MME, la vitesse de réaction décroît en approchant de l'équilibre thermodynamique, sans doute à cause de la formation d'une couche d'eau plus importante autour des sites actifs. Après 6 j de réaction, le taux de conversion en milieu sec devient supérieur à celui en milieu saturé. Lorsque le toluène est saturé en eau, il faut ainsi un temps beaucoup plus long pour atteindre l'équilibre thermodynamique aux alentours des 41%.

Lorsque la proportion de toluène passe de 50 à 35% (essai 5), le taux de conversion chute de façon importante, et de l'acide benzoïque cristallise. Il est indispensable, par conséquent, d'avoir un volume minimum de toluène pour, d'une part, solubiliser tout l'acide benzoïque et, d'autre part, rendre possible la synthèse du benzoate de méthyle.

Une possibilité d'augmenter la vitesse initiale et le taux de conversion est d'augmenter la teneur en MME (essai 6). Il est bien connu que la vitesse initiale est fonction

de la quantité d'enzyme. Le plus étonnant est l'augmentation du taux de conversion, car le catalyseur n'intervient pas théoriquement dans la thermodynamique de réaction. Il est envisageable que l'eau libérée lors de l'estérification est "pompée" par une partie des 25 g de MME/l : cette dernière fonctionne comme un déshydratant. La MME commerciale est sans doute trop déshydratée pour notre réaction.

Ceci est confirmé par l'aspect de la poudre catalytique au cours de la réaction. Avec 25 g de MME/l (essai 6), une grande partie du catalyseur est formée de grains fins à la fin de la réaction, alors que pour 12,5 g/l (essai 4), plusieurs agrégats apparaissent lors des premiers jours, et, en fin de réaction, toute la MME est agglomérée.

La réutilisation de la MME dans l'essai 7, après l'avoir filtrée, lavée à l'acétone et lyophilisée, donne des taux de conversion plus faibles. Il se peut toutefois que l'étape de lyophilisation altère une partie de la MME, ce qui peut fausser les conclusions. Les taux de conversion de l'essai 8 obtenus avec la MME purifiée sont encore plus faibles. Les essais 7 et 8 semblent démontrer que les impuretés présentes dans la poudre catalytique sont donc nécessaires pour acquérir une activité supérieure. Ce fait avait déjà été observé par Yamane (1989). Monot (1993), par contre, trouve que les impuretés ont un effet défavorable sur l'activité enzymatique.

L'étape de purification, dans notre cas, n'est pas avantageuse. Il est préférable d'employer la poudre catalytique brute.

### **C.2.3. Conclusion**

Plusieurs points ont été abordés dans le paragraphe C.2. :

- la saturation en eau du toluène modifie la cinétique apparente d'estérification en augmentant l'activité enzymatique en début de réaction,

- la MME se comporte à la fois comme catalyseur et déshydratant. Ce double rôle suppose une optimisation de la teneur en catalyseur dans le réacteur afin de déplacer l'équilibre dans le sens estérification tout en minimisant les coûts dus au catalyseur,

- la purification de la MME a un effet négatif sur l'activité enzymatique. Ceci pose également le problème de la réutilisation de cette enzyme, car le lavage à l'acétone et la lyophilisation semblent éliminer une partie de ses impuretés, ou du moins désactiver une partie de la MME,

- la proportion des solvants est un paramètre qu'il faudra étudier : l'hydrophobie du milieu, et donc l'activité enzymatique, dépend de la proportion de toluène,

- dans une certaine limite, l'apport d'eau est indispensable. Ce phénomène a déjà été décrit dans la partie bibliographique,

- la MME ne convient pas aux objectifs de départ car le taux de conversion maximal (69%), bien qu'il soit supérieur à celui de Kodera (1986), est insuffisant, et il serait trop difficile d'améliorer cette valeur de manière significative. Par conséquent, les travaux avec la MME ont été abandonnés pour s'orienter vers des systèmes employant la CRL. En effet, certains résultats obtenus en parallèle sont beaucoup plus proches du but désiré.

### C.3. UTILISATION DE LA LIPASE DE *Candida rugosa* (CRL)

#### C.3.1. CRL utilisée directement avec des solvants saturés en eau

##### C.3.1.1. Comparaison toluène sec - toluène saturé en eau

Dans un premier temps, les conclusions avec la MME ont été vérifiées pour savoir si elles sont applicables avec la CRL, en particulier l'influence de la saturation en eau du toluène (Tableau C.3.1.1).

Essai	Hydratation du toluène	Temps de réaction (j)	Taux de conversion (%)
9	séché sur tamis moléculaire	1	1,5
		3	7,3
		7	38,4
10	saturé en eau	1	6,5
		3	31,6
		7	94,2

Tableau C.3.1.1 : Influence de l'état d'hydratation du toluène pour la synthèse du benzoate de méthyle.

[BzOH] 100 mM, [MeOH] 125 mM, hexane (sec)/toluène 50/50, CRL 10 g/l.

Il est donc judicieux de saturer en eau le toluène : dans ce cas, la réaction est beaucoup plus rapide. Il faut signaler que la réaction avec le toluène sec donne des taux de conversion similaires, mais après des temps de réaction plus longs.

Avec des conditions voisines par rapport à l'essai 4 avec la MME, l'essai 10 donne des résultats prometteurs. La CRL permet l'estérification de l'acide benzoïque avec des taux de conversion supérieurs à 90% après 7 j de réaction sans optimisation préalable.

### C.3.1.2. Estimation de l'influence de quelques facteurs sur la réaction d'estérification

A partir de l'essai 10, les facteurs ont été modifiés les uns après les autres pour avoir une idée de leur influence sur la vitesse d'estérification et le taux de conversion (Tableau C.3.1.2).

Essai	[BzOH] (mM)	[MeOH] (mM)	Hexane/toluène saturés en eau (v/v)	Teneur de CRL (g/l)	Temps de réaction (j)	Taux de conversion (%)
10	100	125	50/50	10	1	6,5
					3	31,6
					7	94,2
11	100	<b>100</b>	50/50	10	1	9,4
					3	45,4
					7	79,2
12	100	<b>250</b>	50/50	10	1	1,3
					8	2,2
13	100	125	50/50	<b>5</b>	2	7,9
					4	16,1
					7	47
					8,5	69
14	100	125	50/50	<b>25</b>	1	13,2
					2	47
					5	94
15	100	125	50/50 <b>Température ambiante</b>	10	1	5,1
					4	32
					7,5	81,2
16	100	125	<b>30/70</b>	10	4	45,3
					7	82
					8	86

**Tableau C.3.1.2 : Influence de certains facteurs sur la synthèse du benzoate de méthyle.**

Les notes en gras indiquent le facteur modifié par rapport à l'essai 10.

Le Tableau C.3.1.2 amène les déductions suivantes.

a) En faisant varier la concentration en méthanol (essais 10, 11 et 12), l'effet inhibiteur de ce substrat est mis en évidence : les vitesses initiales diminuent de manière significative lorsque sa concentration passe de 100 à 125 mM (essais 11 et 10). L'essai 12



semble confirmer que le méthanol est inhibiteur de la réaction d'estérification, car, avec 250 mM de méthanol, la synthèse n'a quasiment plus lieu.

Par ailleurs, en abaissant la concentration en méthanol à 100 mM (essai 11), le taux de conversion final est sensiblement inférieur. Il faut sans doute un léger excès de méthanol pour déplacer l'équilibre en faveur de la synthèse.

Il est envisageable également que, même si la quantité de méthanol est théoriquement suffisante, le contact avec le complexe acyl-enzyme est défavorisé. En particulier, le méthanol, à 37°C, a une tension de vapeur non négligeable de 0,3 bar (Daubert and Danner 1985) et une partie se retrouve sous forme vapeur dans le réacteur.

b) En observant les résultats obtenus pour les essais 10, 13 et 14, la teneur en CRL est un paramètre intervenant au niveau cinétique. Ceci avait déjà été remarqué avec la MME. Avec 25 g de CRL/l, un taux de conversion de 94% est déjà atteint après 5 jours de réaction. Par contre, avec 5 g/l, la réaction atteint plus lentement des taux de conversion supérieurs à 90% : il faut plus de 10 jours pour obtenir ce résultat. Contrairement à la MME, le taux de conversion final n'est pas dépendant de la teneur en CRL.

c) Travailler à température ambiante (essai 15) ralentit la vitesse d'estérification.

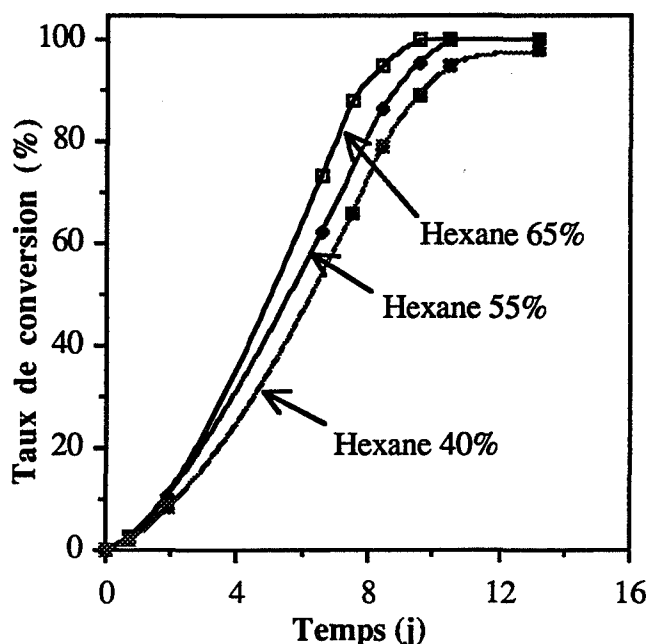
d) En augmentant la proportion de toluène saturé en eau (essai 16), la vitesse d'estérification est plus lente en fin de réaction. La quantité de toluène est sans doute le facteur limitant, soit pour des problèmes de diffusion des substrats vers le site catalytique, soit pour une répartition des substrats et produits moins favorable.

Il faut cependant signaler que le phénomène d'autocatalyse n'apparaît pas dans cet essai. Ceci peut signifier que l'eau introduite par le toluène, lorsque celui-ci représente 50% volumique du mélange, n'est pas suffisante pour hydrater correctement la CRL.

Contrairement à la MME, l'équilibre thermodynamique de la réaction est proche des 94%. La MME est donc sans doute désactivée lors de la réaction, ce qui explique que les taux de conversion maximaux obtenus avec 12,5 g de MME/l ne dépassent pas 50%.

### C.3.1.3. Influence de la proportion des solvants dans le milieu organique

Afin de trouver le mélange optimal pour l'estérification, il est intéressant de suivre l'influence de la fraction volumique hexane/toluène sur la réaction. Les réactions ont été réalisées avec des solvants humides, mais non saturés, provenant de leur bouteille de stockage (Figure C.3.1.3.a).



**Figure C.3.1.3.a** : Effet de la proportion d'hexane sur l'estérification de l'acide benzoïque par le méthanol.

*[BzOH] 100 mM, [MeOH] 125 mM, CRL 10 g/l, solvants humides non-saturés.*

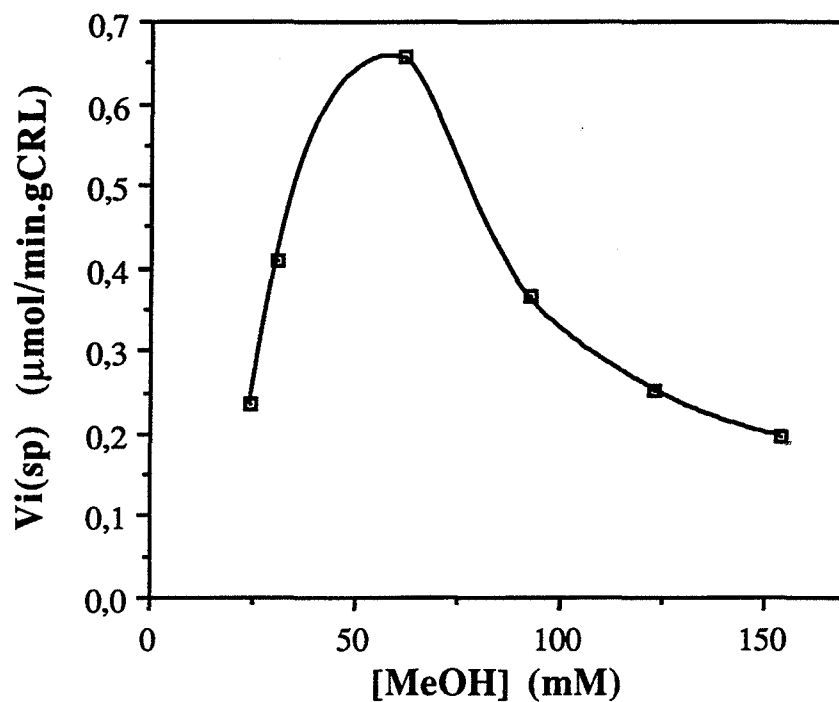
Dans ces conditions, il est préférable d'augmenter la proportion d'hexane dans le mélange : la réaction est plus rapide et atteint des taux de conversion supérieurs à 99% après 9 j de réaction.

En fait, le toluène utilisé n'est pas saturé en eau et a tendance, comme il a été auparavant précisé, à désorber une partie de l'eau présente autour de l'enzyme et à désactiver une partie du biocatalyseur, réduisant ainsi la vitesse initiale. Ainsi, plus il y a de toluène dans le milieu organique, plus il faut de temps pour atteindre des taux de conversion proches de 100%. Pour un mélange contenant 40% d'hexane, la réaction n'a pas encore atteint son équilibre thermodynamique après 13 j de réaction (Figure C.3.1.3.a).

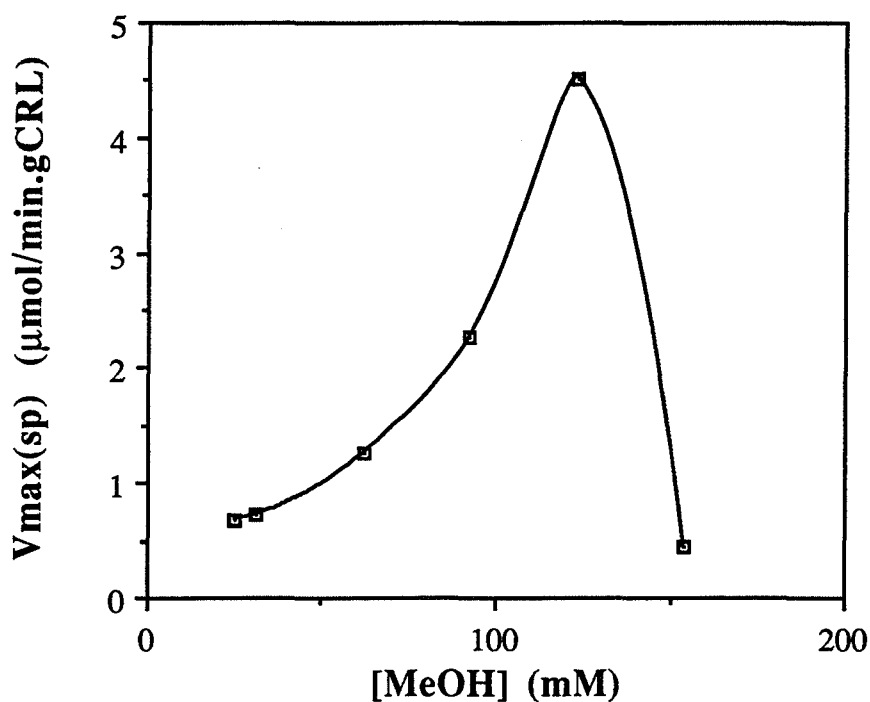
En amenant la proportion volumique de l'hexane à des valeurs supérieures à 75%, l'acide benzoïque recristallise. Le manque de solubilité de l'acide benzoïque dans les milieux riches en hexane limite le champ d'investigation pour ce facteur. Le mélange optimal, dans ces conditions opératoires, est, par conséquent, hexane/toluène : 65/35.

#### C.3.1.4. Influence de la concentration en méthanol

Pour visualiser plus facilement l'effet inhibiteur du méthanol, l'étude des courbes de vitesse spécifique de réaction en fonction de la concentration en méthanol est la plus appropriée. En raison des allures autocatalytiques des courbes obtenues,  $V_i(sp)$  et  $V_{max}(sp)$  ont été étudiées (Figures C.3.1.4.a et C.3.1.4.b).



**Figure C.3.1.4.a :** Effet de la concentration en méthanol sur la  $V_i(sp)$ .  
*[BzOH] 100 mM, hexane/toluène saturés en eau 60/40, CRL 10 g/l.*



**Figure C.3.1.4.b :** Effet de la concentration en méthanol sur la  $V_{\text{max}}(sp)$ .  
*Conditions identiques à la Figure C.3.1.4.a.*

Les courbes n'ont pas la même allure, laissant présager que le système catalytique se comporte différemment pendant la réaction.

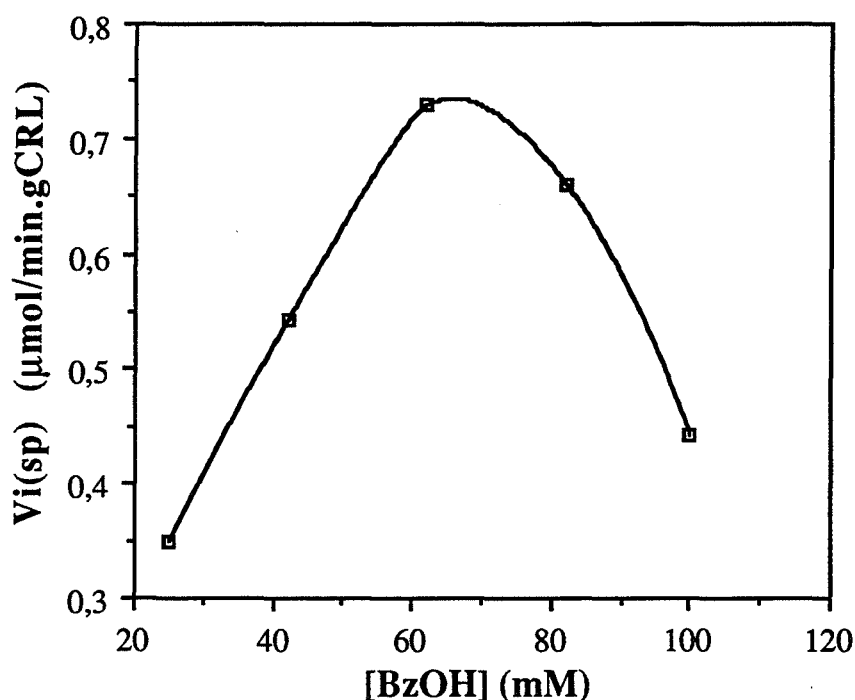
Sur la Figure C.3.1.4.a,  $V_i(sp)$  augmente jusqu'à 60 mM pour atteindre 0,67  $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ , puis décroît. L'inhibition apparaît pour des concentrations en MeOH supérieures à 60 mM (optimum de la courbe).

Sur la Figure C.3.1.4.b,  $V_{\text{max}}(sp)$  atteint un optimum de 4,6  $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$  pour 125 mM de MeOH pour ensuite diminuer très rapidement.

L'allure autocatalytique des courbes obtenues complice de ce fait l'étude de la cinétique d'estérification. Selon la figure étudiée, l'inhibition apparaît dès 60 ou dès 125 mM. Cette différence est la conséquence, d'une part, de l'augmentation de la désorption de l'eau entourant la CRL avec l'augmentation de la concentration en MeOH, et, d'autre part, de la production d'eau au cours de la réaction.

### C.3.1.5. Influence de la concentration en acide benzoïque

Une gamme de concentrations en acide benzoïque comprises entre 25 et 100 mM a été choisie, car, au-delà de 100 mM, l'acide benzoïque a tendance à recristalliser. Avec les conditions opératoires définies, le phénomène d'autocatalyse est quasi inexistant. C'est pourquoi seule la vitesse initiale a été suivie (Figure C.3.1.5.a).



**Figure C.3.1.5.a :** Effet de la concentration en acide benzoïque sur la  $V_i(sp)$ .  
*[MeOH] 125 mM, hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l.*

Sur la Figure C.3.1.5.a, l'inhibition par l'acide benzoïque est mise en évidence : la vitesse initiale spécifique décroît à partir de 60 mM d'acide, optimum de la courbe.

### C.3.1.6. Conclusion

L'effet de certains facteurs a été étudié, en particulier les inhibitions par le méthanol et l'acide benzoïque ont été mises en évidence. Cependant, l'allure sigmoïdale des courbes en fonction du temps représente une cinétique beaucoup plus compliquée à modéliser. De plus, elle dépend de la concentration en acide benzoïque et de la quantité d'eau introduite initialement.

### C.3.2. CRL préalablement incubée dans du toluène saturé en eau

Etant donné les problèmes d'autocatalyse, un conditionnement préalable de la CRL par incubation 1 heure à 37 °C avec 7 ml de toluène saturé en eau a été envisagé.

#### C.3.2.1. Effet de l'incubation

L'incubation de la CRL en présence de toluène permet de diminuer la phase autocatalytique de la courbe (Figure C.3.2.1.a). Le temps de "latence", pendant lequel la vitesse de réaction est faible, est moins important. Par ailleurs, la  $V_i(sp)$  est plus importante avec la CRL préalablement incubée. Un taux de conversion de 10% est atteint après 0,5 j de réaction avec la CRL incubée en présence de toluène et seulement 0,7 j sans incubation de la CRL.

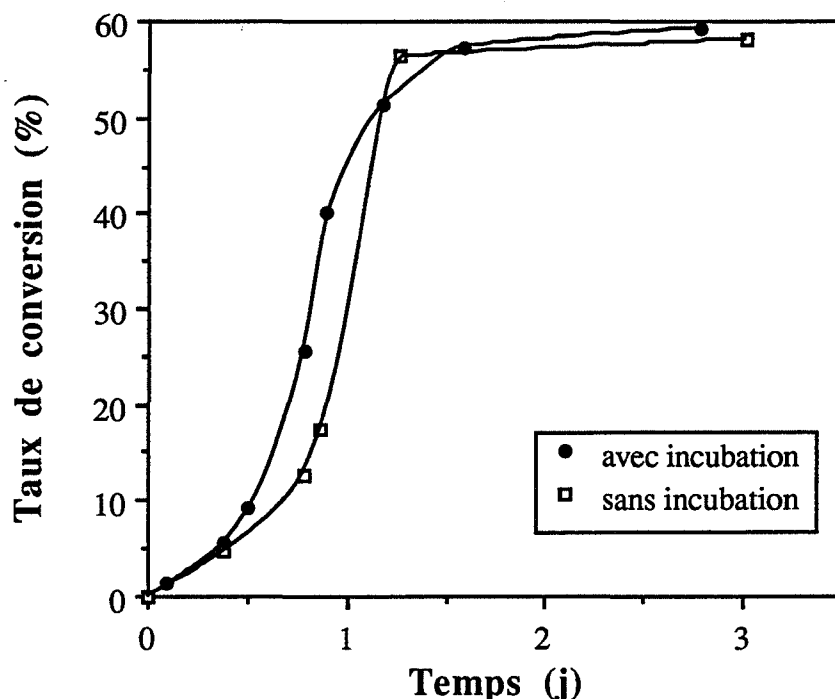


Figure C.3.2.1.a : Effet de l'incubation sur la réaction.

[BzOH] 100 mM, [MeOH] 63 mM, hexane/toluène saturés en eau 60/40, CRL 10 g/l.

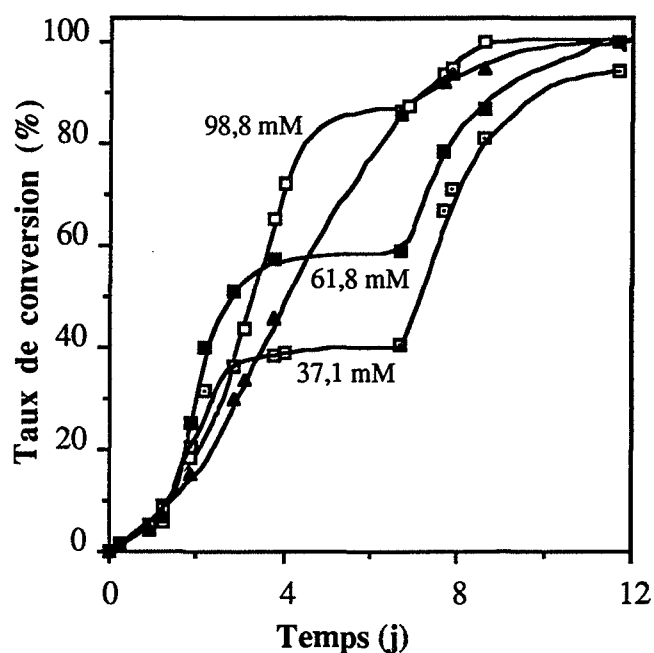
L'apport d'eau par le toluène saturé en eau et le conditionnement de la CRL par le toluène affectent donc l'aspect cinétique de la réaction : le méthanol, en défaut, a totalement réagi après 2 j de réaction. Par contre, la réaction après incubation en présence de toluène est plus lente pour atteindre son équilibre thermodynamique.

Par conséquent, l'incubation modifie la  $V_i(sp)$  de façon favorable. Certains facteurs vont être étudiés dans ces conditions.

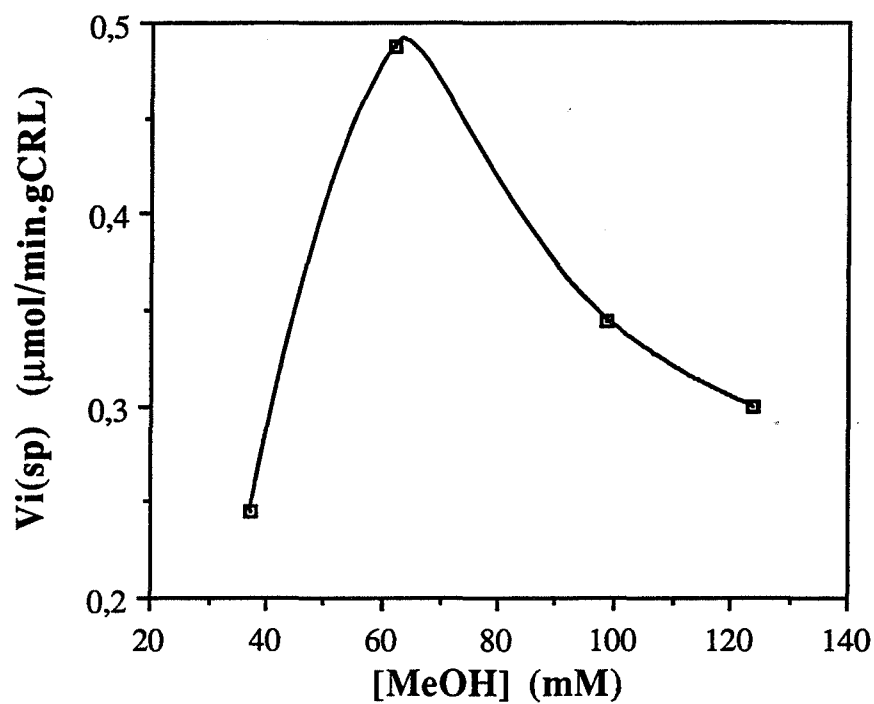
### C.3.2.2. Effet de la concentration en méthanol

La Figure C.3.2.2.a représente les courbes de taux de conversion en fonction du temps.

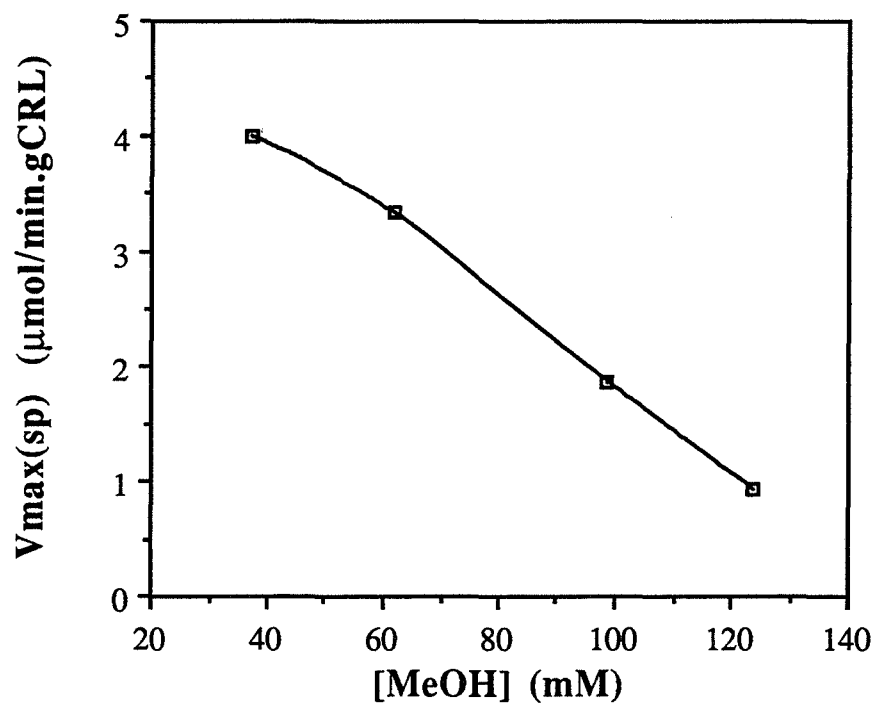
Les courbes sont des sigmoïdes avec un temps de latence inférieur aux essais sans incubation (Figure non montrée). Lorsque tout le méthanol en défaut a réagi, après 7 j de réaction, du méthanol est rajouté pour obtenir une concentration totale de 123,5 mM. La réaction alors se poursuit pour donner un taux de conversion proche de 100%.



**Figure C.3.2.2.a :** Effet de la concentration en méthanol sur la réaction d'estérification.  $[BzOH]$  100 mM, hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l.



**Figure C.3.2.2.b :** Effet de la concentration en méthanol sur la vitesse initiale spécifique.  
*Conditions identiques à la Figure C.3.2.2.a.*



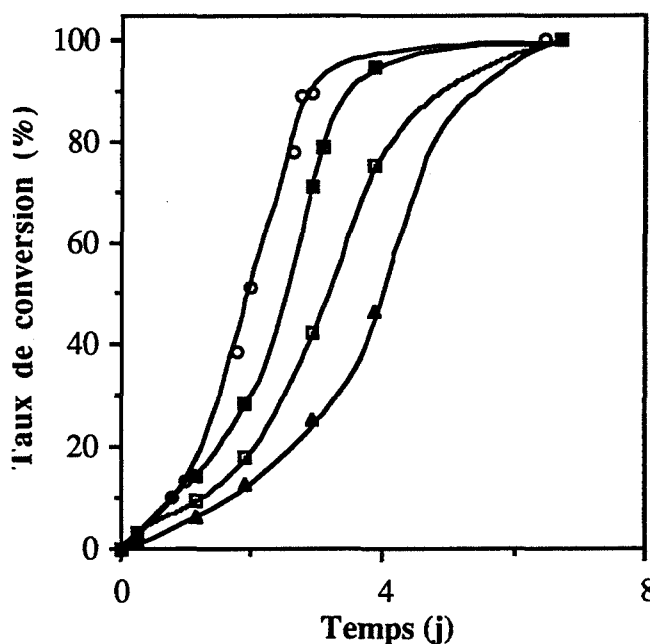
**Figure C.3.2.2.c :** Effet de la concentration en méthanol sur la vitesse maximale spécifique.  
*Conditions identiques à la Figure C.3.2.2.a.*

Le tracé de  $V_i(sp)$  et  $V_{max}(sp)$  (Figures C.3.2.2.b et C.3.2.2.c) diffère des résultats obtenus lorsqu'il n'y a pas d'incubation (cf Figures C.3.1.4.a et C.3.1.4.b). La  $V_i(sp)$  optimale est obtenue pour une concentration de 60 mM, alors que la  $V_{max}(sp)$  décroît déjà à partir de 35 mM (concentration la plus faible). Pour les vitesses initiales, il y a peu de variations par rapport aux réactions sans incubation (Figure C.3.1.4.a). Cependant, la comparaison des courbes des vitesses maximales indique le contraire (Figures C.3.1.4.b et C.3.2.2.c). Il faut tout de même faire attention car les différences constatées entre ces courbes peuvent être la conséquence de conditions initiales légèrement différentes. En effet, les proportions de solvants sont différentes.

Cette contradiction, cependant, confirme que ce système catalytique est complexe et qu'il existe des interactions entre quantité d'eau présente autour de l'enzyme et inhibition par le méthanol.

### C.3.2.3. Influence de la quantité de CRL

En comparant les essais sans et avec incubation (teneur de 5g/l), les avantages de l'incubation sont une vitesse initiale plus élevée et un taux de conversion supérieur à 90% atteint plus rapidement (Figure C.3.2.3.a).



**Figure C.3.2.3.a :** Influence de la teneur en CRL et de l'incubation sur la réaction d'estérification.

$[BzOH]$  50 mM,  $[MeOH]$  63 mM ; hexane/toluène saturés en eau 50/50.

Teneur en CRL : sans incubation    ▲ 5 g/l,  
    avec incubation    ◻ 5g/l, ■ 10 g/l, ○ 15 g/l



L'augmentation de la teneur en CRL permet également d'obtenir une vitesse initiale supérieure et d'atteindre l'équilibre thermodynamique plus rapidement (Figure C.3.2.3.a). Il faut toutefois souligner que, économiquement parlant, le catalyseur est l'élément le plus cher, et il faut faire un compromis entre efficacité catalytique et coût de réaction. Dans ce but, une valeur de 10 g/l de CRL a été choisie pour la suite.

#### **C.3.2.4. Conclusion**

L'apport d'eau par incubation permet d'augmenter la vitesse initiale et de diminuer le temps de réaction. Par conséquent, il faut un état d'hydratation initialement plus important pour activer la réaction : l'addition d'eau au milieu de réaction peut permettre d'améliorer les performances de la CRL.

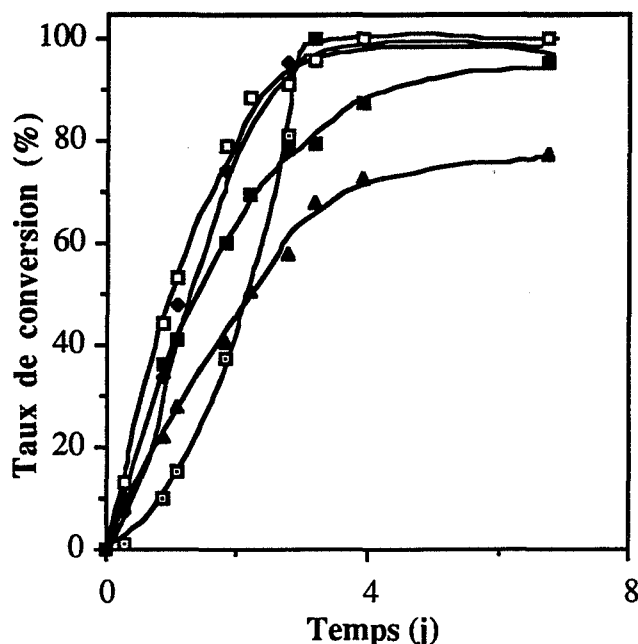
### **C.3.3. Influence de l'eau dans le milieu réactionnel**

#### **C.3.3.1. Effet de l'addition d'un volume d'eau**

Il est important de remarquer, tout d'abord, que la façon d'additionner l'eau dans le milieu de réaction affecte l'estérification. En effet, ceci modifie grandement la morphologie de la poudre et donc la cinétique de réaction. Ainsi, si le mélange n'est pas suffisamment agité après l'ajout d'eau pour permettre une bonne répartition de l'eau, la cinétique de réaction est décrite dans le cas a ci-après. Par contre, en agitant violemment après l'ajout d'eau et en introduisant immédiatement le MeOH, la cinétique d'estérification est alors comme dans le cas b développé ci-après.

##### **Cas a : agitation insuffisante lors de l'ajout d'eau**

Sur la Figure C.3.3.1.a, il est parfaitement visible que le phénomène d'autocatalyse disparaît lorsque plus de 250 mg d'eau/l est ajouté. Les vitesses initiale et maximale sont alors confondues. Cette vitesse augmente avec la quantité d'eau ajoutée (Figure C.3.3.1.b) jusqu'à une teneur en eau de 500 mg/l (valeur optimale de la courbe). Il faut cependant noter qu'au-delà de cette teneur en eau, la vitesse de réaction diminue fortement et il faut un temps plus important pour atteindre une conversion supérieure à 90% (Figure C.3.3.1.a). Ceci confirme que la diffusion des substrats à travers la couche d'eau autour de la lipase et vers les sites actifs devient alors l'étape limitante de la réaction.



**Figure C.3.3.1.a** : Effet de l'addition d'eau avec une agitation insuffisante lors de son ajout.

Teneur en eau ajoutée :    □ 0 mg/l, ♦ 250 mg/l, ■ 500 mg/l,  
    ▲ 1000 mg/l, ■ 1500 mg/l.

*[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l.*

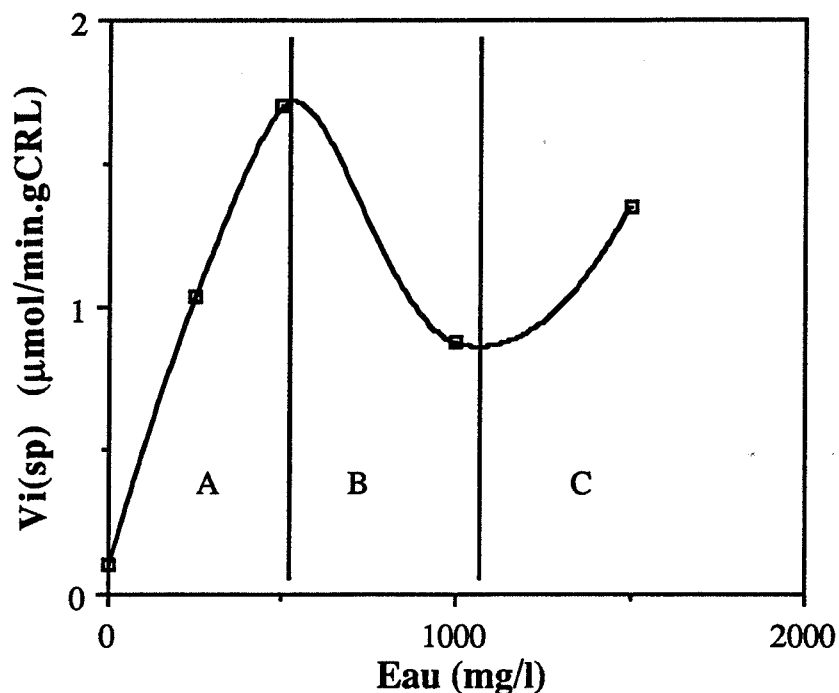
L'allure de la courbe de la Figure C.3.3.1.b, vitesse initiale spécifique en fonction du volume d'eau ajouté, a déjà été observée et publiée par Monot (1991). A faibles additions d'eau (A), la vitesse initiale augmente jusqu'à un maximum proche de 500 mg/l. La vitesse alors décroît (B) pour atteindre un minimum autour de 1000 mg/l, puis augmente à nouveau (C).

La zone A confirme qu'il est indispensable d'hydrater la CRL pour favoriser son activité enzymatique.

La zone C correspond à la formation d'un système biphasique dont la phase aqueuse est discrète (microémulsion).

La zone B intermédiaire représente le passage d'un système microaqueux à un mélange biphasique. Dans cette zone, la phase catalytique se modifie : la quantité d'eau est suffisante pour saturer les solvants et former une pellicule d'eau autour de l'enzyme. Autour de l'excès d'eau se créent des agrégats d'enzyme. La vitesse de réaction chute à cause de la limitation d'accès des substrats aux sites catalytiques à travers ces agrégats.

Il serait judicieux, néanmoins, de rajouter quelques points pour déterminer les changements de systèmes avec beaucoup plus de précision.



**Figure C.3.3.1.b :** Effet de l'addition d'eau sur la  $V_i(sp)$  d'estérification.  
*[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l.*

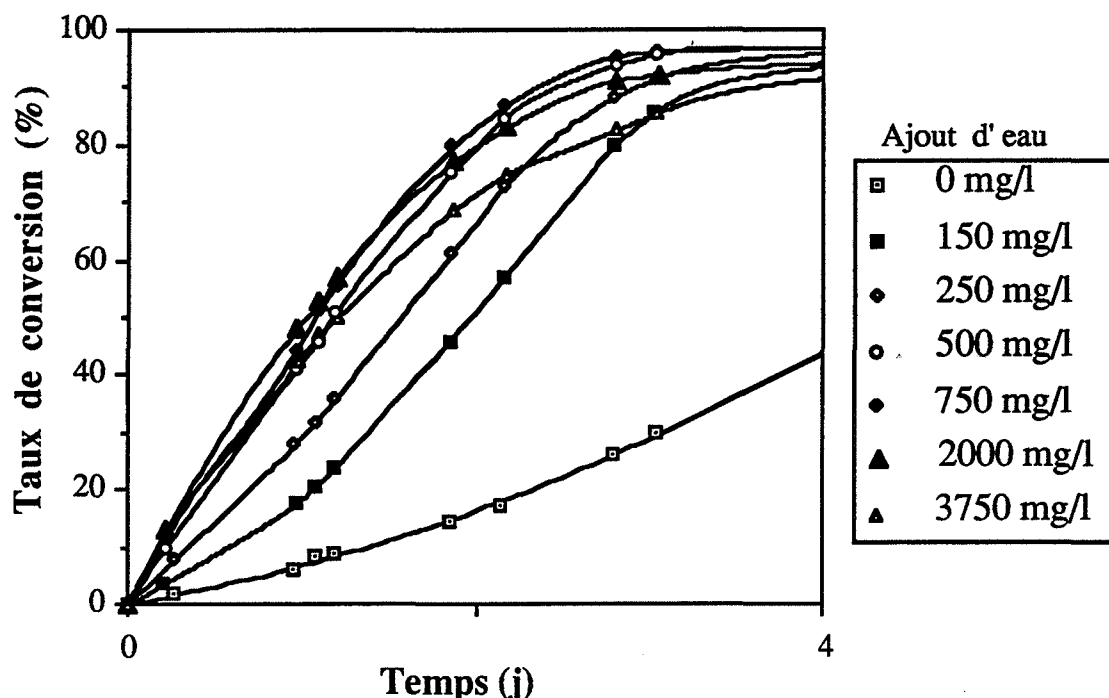
L'allure de la courbe est très difficilement reproductible car la façon d'ajouter l'eau dans le milieu modifie grandement l'aspect de la poudre catalytique. Par ailleurs, la même allure de courbe est obtenue en ajoutant un tampon phosphate pH 7 de concentration 100 mM plutôt que de l'eau. En fait, la chute importante autour de 1000 mg/l peut disparaître si l'agitation permet d'éviter la formation d'un gros amas de CRL au fond du tube. Ce point est présenté dans le cas b ci-après.

cas b : agitation suffisante

L'addition d'eau dans le système modifie profondément l'évolution du taux de conversion en fonction du temps (Figure C.3.3.1.c). Jusqu'à 500 mg/l, les courbes sont de type autocatalytique. Le "temps de latence" diminue avec l'ajout d'eau. Au-delà de 500 mg/l, aucun effet autocatalytique n'est observable : la vitesse initiale correspond à la vitesse maximale. Cependant à partir de 1000 mg/l (évolution optimale), bien que la vitesse initiale soit optimale (Figure C.3.3.1.d), l'évolution de la réaction est plus lente, et des taux de conversion supérieurs à 90% sont atteints bien plus tardivement. Ainsi la réaction est ralentie à cause de l'addition d'une trop grande quantité d'eau.

Quel que soit l'ajout d'eau, le taux de conversion est supérieur à 95% après 7 j de réaction. Ceci semble indiquer que l'addition d'eau, même en quantité importante, n'agit pas

sur l'équilibre thermodynamique de la réaction d'estérification, mais, par contre, modifie les données cinétiques.

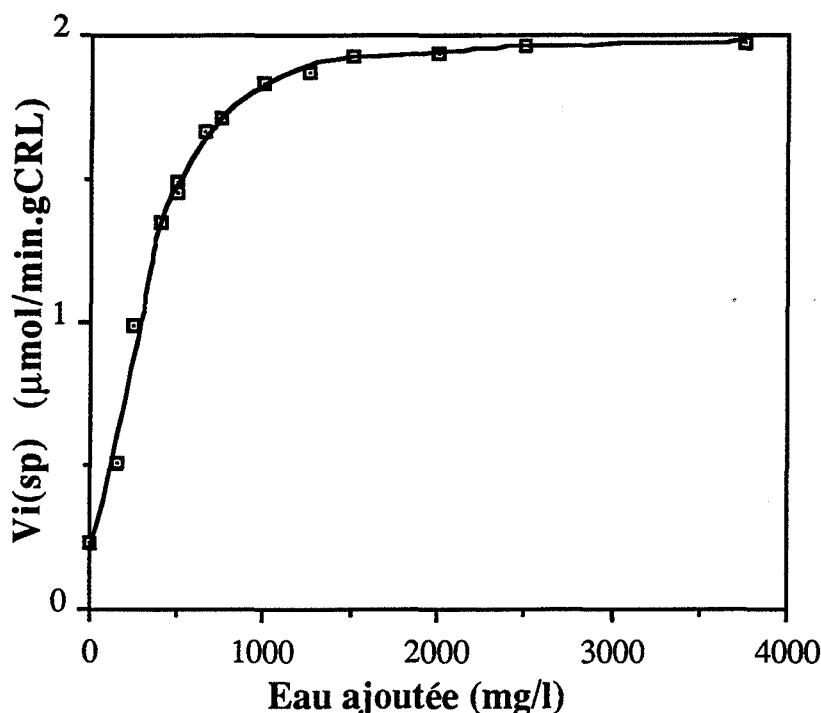


**Figure C.3.3.1.c :** Effet de l'addition d'eau avec une agitation violente lors de son ajout. *[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, CRL 10 g/l, hexane/toluène saturés en eau 50/50.*

Après 7 j de réaction (Figure non montrée), l'observation de la poudre catalytique montre des changements morphologiques importants. De 0 à 400 mg/l, la poudre enzymatique est constituée de particules fines restant en suspension (Photo 1 en annexe). Le volume apparent de la poudre semble plus important, comme si la poudre avait gonflé pendant la réaction. Entre 400 et 500 mg/l, quelques particules plus grosses apparaissent. Ces particules sont constituées de plusieurs grains de poudre. A 650 mg/l, le nombre de ces particules augmente et une partie de la poudre a tendance à se coller au fond du réacteur. A 750 mg/l, des agrégats se forment à partir de quelques particules et la phase solide se sédimente plus rapidement. Une partie de la poudre se colle au fond du réacteur. Après 1250 mg/l, les agrégats se collent à leur tour au fond du réacteur et leur aspect devient laiteux, et forment, quand l'ajout d'eau augmente, des amas de plus en plus compacts (Photos 2 et 3 en annexe). A 3750 mg/l, toute la poudre se retrouve dans une grosse boule pâteuse qui a moins tendance à coller aux parois du réacteur.

En fait, cette évolution de la morphologie de la poudre a été observée tout au long de la réaction. Les essais avec ajouts d'eau importants, sont passés par tous les stades décrits. Pour des ajouts plus importants, les particules apparaissent lors de l'addition de l'eau.

Ces quelques observations permettent de mieux comprendre l'évolution de la vitesse initiale spécifique et des taux de conversion à temps donnés en fonction de l'ajout initial d'eau. Ces courbes sont présentées dans les Figures C.3.3.1.d et C.3.3.1.e.



**Figure C.3.3.1.d :** Influence de l'ajout d'eau sur la  $V_i(sp)$  (agitation violente).  
[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, CRL 10 g/l, hexane/toluène saturés en eau 50/50.

Dans les conditions de réaction choisies, la  $V_i(sp)$  optimale est obtenue à partir d'un ajout de 1000 mg d'eau/l.  $V_i(sp)$  alors reste quasiment constante jusqu'à 3750 mg/l et est égale environ à 1,9  $\mu\text{mol/min.gCRL}$ . Il faut cependant rappeler que pour des valeurs inférieures à 500 mg/l, la  $V_i(sp)$  observée n'est pas la vitesse optimale car la poudre catalytique n'a pas son hydratation optimale. Les courbes observées -taux de conversion en fonction du temps- présentent alors une allure sigmoïdale (Figure C.3.3.1.c). Ce phénomène est d'autant plus marqué que l'ajout d'eau est faible au départ : la  $V_i(sp)$  devient alors très faible. Par exemple, sans ajout d'eau, la  $V_i(sp)$  est 8 fois plus faible que la  $V_i(sp)$  optimale.

L'ajout d'eau permet donc d'activer la lipase, qui est sans doute initialement dans un état d'hydratation trop faible (humidité de la poudre : 3,1%). L'évolution des taux de conversion en fonction de l'addition d'eau à différents temps de réaction est représentée sur la Figure C.3.3.1.e. Nous constatons que, pour un temps de conversion donné, un taux de conversion maximal est obtenu pour une addition en eau donnée. Ce maximum se déplace vers les faibles ajouts d'eau avec l'avancement de la réaction. Ainsi, après 12 h de réaction, l'ajout d'eau optimal est de 1000 mg/l, alors qu'il n'est que de 500 mg/l après 72 h.

Ce phénomène, comme il a déjà été dit, est purement d'ordre cinétique puisque l'estérification n'est pas bloquée et des taux de conversion voisins sont obtenus après des temps de réaction plus longs. En effet, la répartition du benzoate de méthyle est en faveur de la phase organique : le coefficient de partage de BzOMe entre le toluène et l'eau et l'hexane et l'eau est respectivement égal à 500 et 120 (Halling 1990). L'équilibre au niveau du site catalytique est donc déplacé en faveur de la formation de l'ester.

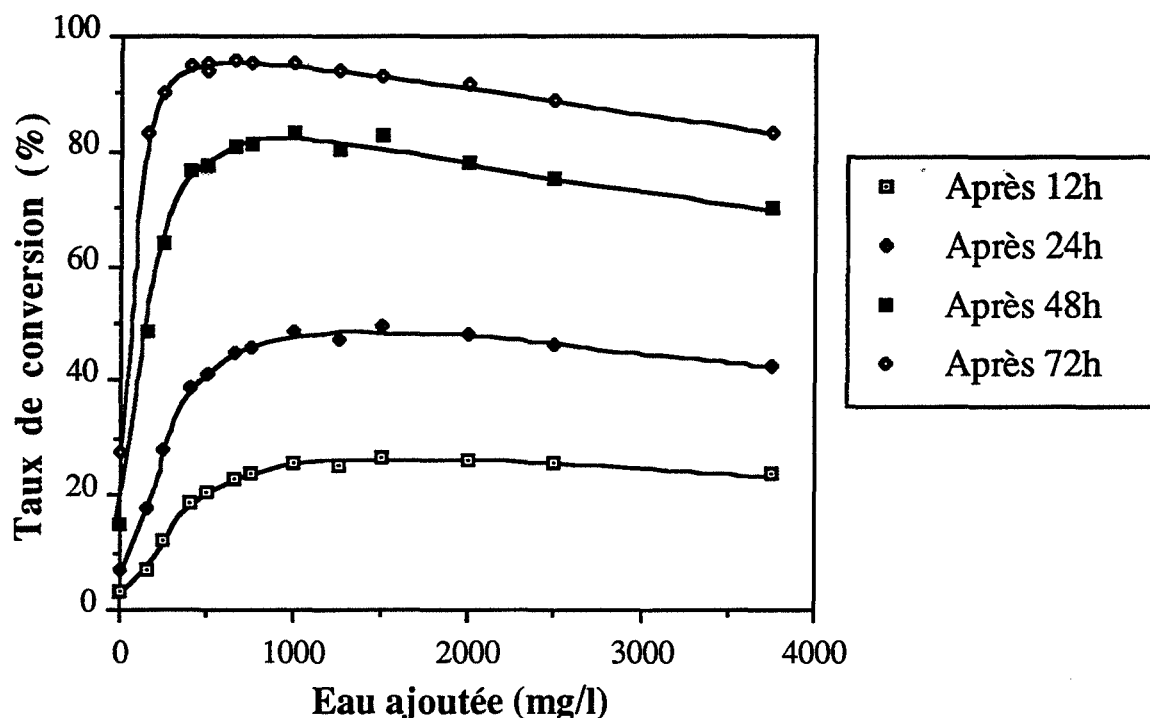


Figure C.3.3.1.e : Influence de l'ajout d'eau sur les taux de conversion à temps donnés.  $[BzOH]$  50 mM,  $[MeOH]$  62 mM, CRL 10 g/l, hexane/toluène saturés en eau 50/50.

L'eau nécessaire en début de réaction devient ensuite un frein pour la réaction. Ceci est perceptible en observant la variation de la pente après l'optimum (Figure C.3.3.1.e). Cette pente est de plus en plus décroissante avec le temps de réaction. Il s'agit sans doute d'une limitation d'accès des substrats, et plus particulièrement de l'acide benzoïque, vers les sites catalytiques car ils doivent traverser une pellicule d'eau entourant la molécule de lipase de plus en plus épaisse. Cette hypothèse est confirmée par l'observation de la morphologie de la poudre catalytique. De plus, la formation d'agrégats de plus en plus gros diminue la surface de contact entre les deux phases et le nombre de sites accessibles aux substrats.

Par conséquent, l'ajout d'eau est nécessaire pour activer correctement la lipase en début de réaction. Toutefois, cet ajout doit être suffisamment faible pour atteindre rapidement des taux de conversion élevés et pour maintenir une certaine morphologie de la poudre garantissant une réutilisation de la CRL sans traitement supplémentaire. Un ajout d'eau de 500 mg/l est le meilleur compromis même si la vitesse initiale n'est pas optimale. Toutefois,

il faut s'assurer que le mélange après l'addition d'eau soit suffisamment agité pour réellement observer l'influence de l'ajout d'eau sur la réaction.

### C.3.3.2. Approche par les plans d'expériences

Nous avons choisi cette approche pour pouvoir montrer, d'une part, l'influence de certains facteurs sur la réaction et, d'autre part, démontrer la présence d'interactions entre certains facteurs. Nous n'avons pas cherché à déterminer les conditions optimales de réaction.

#### C.3.3.2.1. Plan factoriel fractionnaire $2^{5-2}$

Cette première approche par un plan d'expériences fractionnaire  $2^{5-2}$  va permettre de souligner l'effet de chaque facteur sur la cinétique et les taux de conversion. Les essais ont été réalisés avec des solvants saturés en eau. Le Tableau C.3.3.2.1.a regroupe les différentes conditions des 8 essais menés de front. Les facteurs, concentration en acide benzoïque (X1), proportion de toluène (X2), teneur en CRL (X3), rapport molaire MeOH/BzOH (X4) et teneur en eau (X5), sont examinés. 8 réponses sont suivies : la vitesse initiale ( $V_i$ ), la vitesse initiale spécifique ( $V_i(sp)$ ), les taux de conversion après 24, 48, 72 et 96 h ( $T_x(24)$ ,  $T_x(48)$ ,  $T_x(72)$  et  $T_x(96)$ ) et les concentrations de BzOMe obtenues ( $n(72)$  et  $n(96)$ ). Les réponses obtenues sont présentées dans le Tableau C.3.3.2.1.b.

Essai	[BzOH] (mM) (X1)	Toluène (%v/v) (X2)	Teneur en CRL (g/l) (X3)	[MeOH]/[BzOH] (mM/mM) (X4) 4=12	Teneur en eau (mg/l) (X5) 5=13
1	51,2 (-1)	40 (-1)	7,5 (-1)	1,5 (+1)	750 (+1)
2	71,7 (+1)	40 (-1)	7,5 (-1)	1,25 (-1)	250 (-1)
3	51,2 (-1)	60 (+1)	7,5 (-1)	1,25 (-1)	750 (+1)
4	71,7 (+1)	60 (+1)	7,5 (-1)	1,5 (+1)	250 (-1)
5	51,2 (-1)	40 (-1)	12,5 (+1)	1,5 (+1)	250 (-1)
6	71,7 (+1)	40 (-1)	12,5 (+1)	1,25 (-1)	750 (+1)
7	51,2 (-1)	60 (+1)	12,5 (+1)	1,25 (-1)	250 (-1)
8	71,7 (+1)	60 (+1)	12,5 (+1)	1,5 (+1)	750 (+1)

Tableau C.3.3.2.1.a : Matrice des essais en valeurs réelles et codées.

En étudiant 5 facteurs à partir de 8 essais, deux aliases,  $4 = 12$  et  $5 = 13$ , sont nécessaires.

Dans le cas de plans fractionnaires, les effets calculés ne sont pas purs : les interactions et les effets directs sont mélangés. En supposant que les interactions du

troisième ordre sont négligeables, les coefficients obtenus sont en réalité la somme de plusieurs composantes :

$$\begin{aligned}
 L_0 &= l_0 & L_4 &= l_4 + l_{12} \\
 L_1 &= l_1 + l_{24} + l_{35} & L_5 &= l_5 + l_{13} \\
 L_2 &= l_2 + l_{14} & L_6 &= l_{23} + l_{45} \\
 L_3 &= l_3 + l_{15} & L_7 &= l_{25} + l_{34}
 \end{aligned}$$

Ainsi, le coefficient  $L_1$  obtenu regroupe l'effet direct  $l_1$  du facteur 1 et les interactions du second ordre entre les facteurs 2 et 4 ( $l_{24}$ ) et entre les facteurs 3 et 5 ( $l_{35}$ ).

Essai	$V_i$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	$V_i(\text{sp})$ ( $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ )	Taux de conversion Tx(24) (%)	Taux de conversion Tx(48) (%)	Taux de conversion Tx(72) (%)	Taux de conversion Tx(96) (%)	[BzOMe] n(72) (mM)	[BzOMe] n(96) (mM)
1	0,220	1,467	28,6	52,8	74,6	87,1	37,3	43,6
2	0,201	1,340	20,2	42,7	67,7	80,4	44,6	56,3
3	0,250	1,667	34,8	64,9	82,9	88,5	41,5	44,3
4	0,146	0,973	20,7	42,6	63,5	79,6	44,5	55,7
5	0,295	1,180	41,1	81,2	94,2	94,9	47,1	47,5
6	0,417	1,668	42,1	79,5	93,5	92,8	65,5	65
7	0,319	1,276	44,6	84,2	93,5	92,8	46,8	46,4
8	0,350	1,400	35,6	68,1	89,4	95,3	68,6	66,7

Tableau C.3.3.2.1.b : Réponses obtenues pour chaque essai.

Les conclusions provenant de ces résultats peuvent donc être entâchées d'une certaine erreur. Dans un premier temps, les interactions comprises dans les coefficients  $L_1$  à  $L_5$  seront considérées comme négligeables devant les effets principaux. Cette hypothèse est généralement appliquée pour simplifier l'exploitation des résultats. Toutefois, il ne faut pas oublier que les conclusions peuvent être faussées par cette simplification. Les coefficients  $L$  sont regroupés dans le Tableau C.3.3.2.1.c.

#### a) Effet sur $V_i$

Pour  $V_i$ , les facteurs concentration en acide benzoïque et proportion en toluène ont très peu d'influence (Tableau C.3.3.2.1.c). Par contre, la teneur en CRL, le rapport molaire MeOH/BzOH et la quantité d'eau influent grandement sur  $V_i$ . Ces conclusions sont normales puisque ces 3 facteurs définissent la répartition de l'eau dans le milieu et plus particulièrement la quantité d'eau autour des molécules de lipase, et donc jouent sur la



cinétique : plus la quantité de catalyseur est importante et son hydratation optimale, plus la  $V_i$  sera élevée. La valeur négative de  $L_4$  est en corrélation avec l'inhibition par le méthanol : si le rapport est augmenté (la quantité de méthanol introduite est plus importante), alors l'inhibition par le méthanol augmente aussi.

La proportion de toluène et la concentration en acide benzoïque ne semblent pas intervenir sur la répartition de l'eau : il est vrai que le toluène a d'abord été saturé en eau. Le BzOH, de même, n'est pas avide d'eau. En effet, en présence d'une atmosphère humide, les cristaux de BzOH n'adsorbent quasiment pas d'eau. Les interactions 45, 23, 34 et 25, intervenant dans les coefficients  $L_6$  et  $L_7$ , semblent négligeables ( $L_6$  et  $L_7$  étant négligeables).

Coefficient	$V_i$	$V_i(sp)$	Tx(24)	Tx(48)	Tx(72)	Tx(96)	[BzOMe] (72)	[BzOMe] (96)
$L_0$	0,275	1,371	33,5	64,5	81,9	88,9	48,7	53,2
$L_1$	0,004	-0,026	<u>-3.8</u>	<u>-6.3</u>	<u>-4.4</u>	<u>-1.9</u>	<u>5.6</u>	<u>7.7</u>
$L_2$	-0,009	-0,042	0,5	0,4	0,4	0,1	0,1	0,1
$L_3$	<u>0,070</u>	0,010	<u>7.4</u>	<u>13.8</u>	<u>10.7</u>	<u>5.0</u>	<u>6.8</u>	<u>3.2</u>
$L_4$	<u>-0.022</u>	<u>-0.120</u>	<u>-2.0</u>	<u>-3.3</u>	-1,5	0,3	-0,9	0,2
$L_5$	<u>0.035</u>	<u>0.179</u>	<u>1.8</u>	<u>1.8</u>	<u>3.2</u>	<u>2.0</u>	<u>3.0</u>	<u>1.7</u>
$L_6$	-0,002	-0,001	-1,2	<u>-2.6</u>	<u>-1.6</u>	0	-0,9	0,1
$L_7$	-0,001	-0,025	-0,5	-0,3	0,6	0,9	0,2	0,5

**Tableau C.3.3.2.1.c** : Tableau des coefficients calculés du plan d'expériences 2<sup>5-2</sup>.

Les coefficients soulignés influent sur la réponse de manière significative.

#### b) Effet sur $V_i(sp)$

En ce qui concerne  $V_i(sp)$ , en rapportant la vitesse initiale de réaction à la masse de biocatalyseur introduit, l'effet important de la teneur en CRL, qui est observé avec  $V_i$ , est alors éliminé. En effet, l'effet du facteur 3 devient alors négligeable devant les autres facteurs. Les facteurs 4 et 5, déjà cités pour  $V_i$ , sont de ce fait les plus influents sur la réponse  $V_i(sp)$ . La présence d'une plus grande quantité d'eau (facteur 4 au niveau (+1) 750 mg/l) active d'autant plus la CRL : 250 mg d'eau/l semble insuffisant pour avoir une activité optimale dans les conditions définies. Le passage du niveau (-1) au niveau (+1) augmente  $V_i(sp)$  moyen de plus de 20%. Il peut être remarqué que la proportion de toluène, dans une moindre mesure, a également un effet négatif sur  $V_i(sp)$ . Ceci a déjà été mis en évidence dans l'approche préliminaire : l'augmentation de la fraction de toluène dans le mélange ralentit la réaction.

Les autres facteurs peuvent être considérés comme peu influents car leur effet est inférieur à 5% sur  $V_i(sp)$ .

c) Effet sur les taux de conversion et les quantités de BzOMe produites

En considérant les taux de conversion après différents temps de réaction, il ressort que le coefficient L3 a l'effet le plus important sur les taux de conversion. Ce coefficient est fortement positif. Ceci est surtout vrai après 24 et 48 h de réaction où le passage du niveau (-1) à (+1), c'est-à-dire d'une teneur en CRL de 7,5 à 12,5 g/l, s'accompagne d'une augmentation du taux de conversion supérieure à 40%. Après 48 h, l'effet positif diminue avec le temps, respectivement 25 et 11% après 72 et 96 h, car la vitesse d'estérification diminue fortement en fin de réaction.

En seconde place se trouve l'effet négatif du facteur L1. Ceci paraît logique dans la mesure où il fait intervenir la concentration initiale d'acide benzoïque, alors que le taux de conversion est calculé par rapport à cette valeur. Ainsi, à vitesse de transformation égale, le taux de conversion sera plus faible pour une plus grande quantité d'acide benzoïque. Ce constat est confirmé si la réponse étudiée est la concentration d'ester produite. Dans ce cas, le coefficient L1 est fortement positif, c'est-à-dire qu'en augmentant la concentration en BzOH de 51,2 (niveau (-1)) à 71,7 mM (niveau (+1)), la concentration en BzOMe produite augmente de 23% après 72 h et 29% après 96 h.

Le coefficient L4 agit plus faiblement sur les taux de conversion, et surtout, cet effet change avec l'évolution de la réaction. Ainsi, il est négatif jusqu'à 72 h et devient négligeable à 96 h. Ce coefficient reflète l'effet inhibiteur du méthanol, puisque L4 prend en compte le rapport molaire MeOH/BzOH. L'inhibition par le MeOH est donc marquée au début de la réaction. Après 48 h, cet effet diminue : le méthanol est consommé avec l'avancement de la réaction. L'effet très légèrement positif en fin de réaction indique qu'un plus fort excès de méthanol permet d'atteindre, plus rapidement, des taux de conversion plus élevés. Cet effet est tout de même négligeable car sa valeur est inférieure au seuil minimum fixé à 5% : la variation du taux de conversion est de 0,6% en passant de (-1) à (+1).

Le coefficient L5 est toujours positif quel que soit le temps de réaction. L'ajout d'une plus grande quantité d'eau semble être favorable à la réaction, même en fin de réaction. L'hydratation de la poudre commerciale est sans doute insuffisante.

Le coefficient négatif L6 n'est pas négligeable pour les taux de conversion. Ce coefficient prend en compte deux interactions du second degré : 23 et 45, qui correspondent respectivement aux interactions proportion de toluène-teneur en CRL et rapport MeOH/BzOH-teneur en eau. Les deux interactions sont peut-être importantes : le toluène n'agit pratiquement pas sur les taux de conversion (coefficient L2) mais peut-être sur le biocatalyseur directement. De même, le méthanol peut agir sur l'hydratation de la CRL en

désorbant plus d'eau. Gorman (1992) a prouvé que le MeOH peut désorber environ 60% de l'eau adsorbée sur une enzyme. Cette valeur dépend de la nature de l'enzyme.

Les coefficients L<sub>2</sub> et L<sub>7</sub> sont négligeables devant les autres coefficients.

#### d) Conclusion

Il subsiste cependant plusieurs points d'interrogation : les conclusions et remarques sur chaque réponse étudiée ne prennent pas en compte le fait que chaque coefficient est la somme de l'effet principal et de plusieurs interactions. Pour confirmer ces conclusions, il serait nécessaire de réaliser un plan complet 2<sup>5</sup> de 32 expériences. Etant donné que la proportion de toluène ne semble pas très influente par rapport aux autres facteurs étudiés, il semble être plus judicieux de faire un nouveau plan d'expériences complet 2<sup>4</sup> en modifiant le domaine d'étude en fonction des résultats trouvés.

Les coefficients ainsi calculés représenteront l'effet pur de chaque facteur et les interactions ne seront pas mélangées avec les effets principaux.

De même, aucun essai n'a été réalisé au centre du domaine expérimental. Ceci ne nous permet pas de valider le modèle car la précision au centre du domaine n'est pas connue.

#### C.3.3.2.2. Plan factoriel complet 2<sup>4</sup>

Le plan factoriel complet 2<sup>4</sup> permet d'estimer l'influence pure des 4 facteurs : concentration en BzOH, teneur en CRL, rapport des concentrations [MeOH]/[BzOH] et teneur en eau, et surtout les interactions possibles entre ces 4 facteurs. Ceci n'a pas pu être réalisé avec la première approche à l'aide du plan factoriel fractionnaire. Les bornes du domaine ont été modifiées. Le Tableau C.3.3.2.2.a présente la valeur naturelle de chaque facteur à son niveau (-1) et (+1). Les essais ont été réalisés dans un mélange équimolaire toluène/hexane saturés en eau.

Facteur	Variable	Niveau (-1)	Niveau (+1)
[BzOH] (mM)	X1	72	102
Teneur en CRL (g/l)	X2	10	15
[MeOH]/[BzOH] mM/mM	X3	1.3	1.6
Teneur en eau (mg/l)	X4	500	750

**Tableau C.3.3.2.2.a :** Valeurs des paramètres aux bornes du domaine d'étude.

Matrice d'expériences					Réponses observées				
Essai	[BzOH]	Teneur en CRL	[MeOH]	Teneur en eau	Vi	Vi(sp)	BzOMe (mmol)		
	(mM)	(g/l)	(mM)	(mg/l)	( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	( $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ )	48h	72h	96h
1	72	10	91	500	0.273	1.365	0.782	1.112	1.297
2	102	10	112	500	0.311	1.555	0.921	1.388	1.730
3	72	15	91	500	0.401	1.337	1.118	1.354	1.369
4	102	15	112	500	0.474	1.580	1.394	1.830	1.865
5	72	10	130	500	0.249	1.245	0.714	1.030	1.258
6	102	10	161	500	0.217	1.085	0.635	0.950	1.263
7	72	15	130	500	0.342	1.140	0.943	1.275	1.369
8	102	15	161	500	0.345	1.150	1.026	1.494	1.822
9	72	10	91	750	0.297	1.485	0.861	1.192	1.337
10	102	10	112	750	0.314	1.570	0.934	1.386	1.732
11	72	15	91	750	0.449	1.497	1.182	1.361	1.360
12	102	15	112	750	0.500	1.667	1.451	1.844	1.875
13	72	10	130	750	0.229	1.145	0.653	0.946	1.172
14	102	10	161	750	0.222	1.110	0.639	0.958	1.277
15	72	15	130	750	0.324	1.080	0.916	1.241	1.360
16	102	15	161	750	0.351	1.170	1.040	1.519	1.840
17	87	12.5	126	625	0.331	1.326	0.978	1.385	1.612

Tableau C.3.3.2.2.b : Matrice d'expériences en valeurs naturelles et réponses obtenues.

5 réponses ont été choisies : la vitesse initiale observée ( $V_i$  en  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), la vitesse initiale spécifique observée ( $V_i(\text{sp})$  en  $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ ), la quantité de BzOMe produite en 48 heures ( $n(48)$  en mmol), en 72 heures ( $n(72)$  en mmol) et en 96 heures ( $n(96)$  en mmol).

Le Tableau C.3.3.2.2.b présente la matrice des 16 essais et les réponses obtenues, ainsi que l'essai au centre du domaine pour valider le modèle choisi (essai 17). La matrice d'expériences est détaillée pour, en particulier, préciser la concentration en MeOH pour chaque essai. Le facteur étudié est cependant le rapport des concentrations  $[\text{MeOH}]/[\text{BzOH}]$ . Celui-ci étant interdépendant de la colonne 1 (concentration en BzOH), ceci explique pourquoi la colonne  $[\text{MeOH}]$  ne comporte pas 2, mais 4 valeurs.

Les réponses sont fonction des facteurs et des interactions possibles entre eux, et peuvent être décrites par le modèle mathématique suivant :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + \dots + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + \dots + b_{34}X_3X_4 + b_{123}X_1X_2X_3 + \dots + b_{234}X_2X_3X_4 + b_{1234}X_1X_2X_3X_4$$

Les coefficients calculés pour chaque réponse sont regroupés dans le Tableau C.3.3.2.2.c. Contrairement au plan factoriel, les coefficients représentent uniquement l'influence du facteur ou de l'interaction considéré.

	Coefficients calculés pour chaque réponse				
	Vi	Vi(sp)	n(48h)	n(72h)	n(96h)
Moyenne calculée					
b <sub>0</sub>	0.331	1.324	0.951	1.305	1.495
Effets directs					
b <sub>1</sub>	<u>0.011</u>	<u>0.037</u>	<u>0.054</u>	<u>0.116</u>	<u>0.180</u>
b <sub>2</sub>	<u>0.067</u>	0.004	<u>0.183</u>	<u>0.185</u>	<u>0.112</u>
b <sub>3</sub>	<u>-0.046</u>	<u>-0.183</u>	<u>-0.130</u>	<u>-0.128</u>	<u>-0.075</u>
b <sub>4</sub>	0.005	0.017	0.009	0.001	-0.001
Interactions					
b <sub>12</sub>	0.009	<u>0.027</u>	<u>0.040</u>	<u>0.066</u>	<u>0.063</u>
b <sub>13</sub>	<u>-0.012</u>	<u>-0.049</u>	<u>-0.040</u>	<u>-0.063</u>	<u>-0.050</u>
b <sub>14</sub>	0.000	0.002	0.002	0.005	0.007
b <sub>23</sub>	<u>-0.012</u>	-0.009	<u>-0.023</u>	<u>0.021</u>	<u>0.066</u>
b <sub>24</sub>	0.003	0.009	0.005	0.001	0.003
b <sub>34</sub>	-0.008	<u>-0.031</u>	<u>-0.018</u>	<u>-0.012</u>	-0.007
b <sub>123</sub>	0.000	0.010	-0.002	0.005	0.040
b <sub>124</sub>	0.000	-0.001	0.002	0.003	-0.001
b <sub>134</sub>	0.006	0.024	0.011	0.014	0.009
b <sub>234</sub>	-0.003	-0.005	0.001	0.008	0.008
b <sub>1234</sub>	0.000	-0.005	-0.005	-0.008	-0.008

Tableau C.3.3.2.2.c : Coefficients calculés du plan factoriel complet.

Les moyennes calculées b<sub>0</sub> pour Vi et Vi(sp) sont identiques aux réponses observées au centre du domaine (essai 17). Par contre, les moyennes calculées pour n(48), n(72) et n(96) sont plus faibles que celles observées (essai 17) (respectivement une erreur de 3, 6 et 8%). Ce sont tout de même des valeurs acceptables, car elles montrent un biais au centre inférieur à 10%.

#### C.3.3.2.2.1. Effets principaux

Les résultats présentés dans le Tableau C.3.3.2.2.c sont valables dans le domaine de travail choisi.

La concentration en BzOH agit de manière positive sur toutes les réponses (coefficient  $b_1$ ). Il n'y a donc pas d'effet d'inhibition avant 100 mM. Ceci n'est pas vrai sans ajout d'eau (voir Figure C.3.1.5.a). Son effet sur la production d'ester (de  $n(48)$  à  $n(96)$ ) augmente avec le temps : ceci n'a rien d'étonnant car, en passant du niveau (-1) à (+1) pour ce facteur, ceci revient à augmenter la concentration en BzOH de 72 à 102 mM : il y a donc davantage de matière première à transformer, et donc plus de BzOMe produit.

Comme pour la concentration en BzOH, le passage d'une teneur de 10 à 15 g/l en CRL a un effet positif sur la production de BzOMe et sur  $V_i$  (coefficient  $b_2$ ). Par contre, ce facteur est peu influent sur  $V_i(sp)$ . Ceci a déjà été constaté avec le plan factoriel : étant donné que la  $V_i(sp)$  est ramenée par gramme de CRL, l'influence de ce facteur est gommé.

Le rapport  $[MeOH]/[BzOH]$  a un effet négatif très grand sur toutes les réponses (coefficient  $b_3$ ). En effet, le MeOH est inhibiteur dans le domaine de travail. Son rôle inhibiteur diminue avec le temps, puisqu'il est consommé pour donner BzOMe.

Par contre, la teneur en eau semble peu influente (coefficient  $b_4$ ). Or, il a été remarqué dans le plan factoriel fractionnaire que ce facteur est plutôt positif pour la réaction. Il semblerait que le domaine de travail pour ce facteur est trop restreint pour montrer son influence sur la réaction. Ce facteur sera étudié plus en détail par la suite.

#### C.3.3.2.2.2. Interactions

Dans le Tableau C.3.3.2.2.c, 4 interactions importantes prédominent. Toutes ces interactions confirment les résultats obtenus sur les effets principaux.

Les coefficients  $b_{12}$  montrent une interaction positive importante entre la concentration en BzOH et la teneur en CRL sur  $V_i(sp)$  et la production de BzOMe. Les réponses les plus élevées sont obtenues pour des facteurs 1 et 2 à des niveaux (+1). Donc, les conclusions sur  $L_5$  (cf paragraphe C.3.3.2.1.) dans le plan factoriel fractionnaire sont erronées car, en fait, le coefficient  $l_{13}$  n'est pas négligeable, ce qui, dans un premier temps, avait été supposé.

Tous les coefficients  $b_{13}$  sont influents, car les facteurs 1 et 3 sont interdépendants (concentration BzOH et rapport  $[MeOH]/[BzOH]$ ). Les niveaux optimaux pour 1 et 3 sont

déterminés en calculant la moyenne des réponses pour lesquelles les signes des facteurs 1 et 3 sont identiques. Par exemple, la moyenne des essais 1, 3, 9 et 11 correspond à la moyenne obtenue pour les facteurs 1 et 3 à des niveaux (-1) et (-1). Cette moyenne permet d'éliminer l'effet des autres facteurs. Les réponses maximales sont obtenues pour les facteurs 1 et 3 à des niveaux (+1) et (-1) respectivement. Cette interaction est présente dans le plan fractionnaire sous  $L_2$  ( $l_{14}$ ) et donc les remarques concernant l'influence de la proportion de toluène (coefficient  $l_2$ ) sont peut-être fausses (cf paragraphe C.3.3.2.1.). L'influence de la proportion de toluène sera développée plus en détail par la suite : les résultats obtenus dans la mise en place du système enzymatique tendent à prouver que la proportion de toluène dans le milieu joue sur la cinétique de réaction.

L'interaction 23 évolue au cours du temps d'une valeur négative ( $V_i$  et  $n(48)$ ) pour devenir positive à  $n(72)$  et  $n(96)$ . Cette interaction représente l'effet inhibiteur du méthanol ( $X_3$ ) sur la poudre enzymatique ( $X_2$ ). Avec l'avancement de la réaction, cet effet évolue car le méthanol est consommé et donc l'inhibition décroît.

L'interaction 34 influe de manière plus faible, mais elle montre que le facteur teneur en eau ( $X_4$ ) agit par ses interactions avec le MeOH. Par contre, les interactions, concentration en BzOH-teneur en eau ( $b_{14}$ ) et teneur en CRL-teneur en eau ( $b_{24}$ ), n'ont pas d'effet sur la réaction.

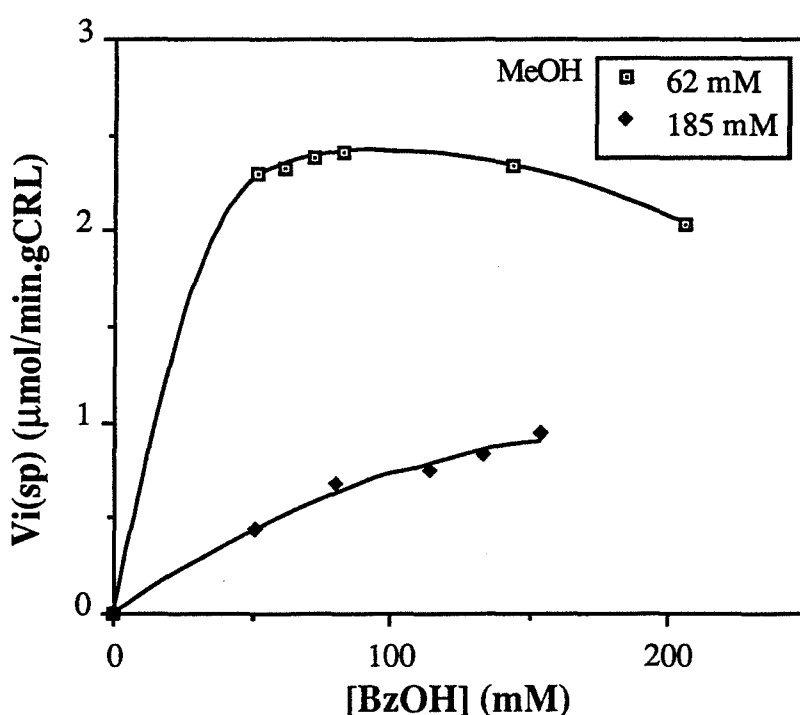
La moyenne optimale est obtenue pour  $X_3$  et  $X_4$  à des niveaux respectifs de (-1) et (+1). Ceci prouverait que l'eau, soit active la CRL, soit protège celle-ci de la désactivation par le MeOH. L'eau agirait donc plus par ses interactions avec le facteur MeOH que directement. Cette interaction correspond à l'interaction  $l_{45}$  du plan fractionnaire.  $l_{45}$  est une composante de  $L_6$  :  $L_6 = l_{23} + l_{45}$  (cf paragraphe C.3.3.2.1.). Les valeurs de  $b_{34}$  et  $L_6$  sont négatives, ce qui semblerait démontrer que  $l_{23}$ , interaction toluène-teneur en CRL, est peu influent.

Les interactions du 3° et 4° degré sont peu influentes.

Par cette approche mathématique, il se dégage que tous ces facteurs agissent sur la réaction, de manière directe ou indirecte. En particulier, le rapport  $[MeOH]/[BzOH]$  agit très négativement sur la réaction. L'influence de la proportion de toluène n'a cependant pas été mise en évidence clairement. Nous allons confirmer ces constatations en examinant ces facteurs un par un. Par ailleurs, le domaine choisi pour certains de ces facteurs est assez réduit et un examen plus poussé est nécessaire.

### C.3.3.3. Influence de la concentration en acide benzoïque en présence d'eau

Ces réactions ont été réalisées avec des solvants saturés en eau, en présence de 500 mg d'eau/l. Pour 62 mM de MeOH, la vitesse initiale spécifique de la réaction diminue à partir de 100 mM en acide benzoïque (Figure C.3.3.3.a). Cette valeur est la limite où l'inhibition par excès d'acide benzoïque apparaît. Une comparaison de ce résultat avec celui obtenu en milieu sec est possible même si la concentration en MeOH n'est pas la même (voir paragraphe C.3.1.5.) : l'ajout d'eau (500 mg/l) semble déplacer l'inhibition vers des concentrations légèrement plus élevées.



**Figure C.3.3.3.a** : Effet de la concentration en acide benzoïque sur la vitesse initiale spécifique.

*Hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l, eau ajoutée 500 mg/l.*

Cet apport d'eau, dans un milieu où les solvants sont saturés en eau, se concentre principalement autour de la poudre catalytique. L'épaisseur de la couche d'eau augmente et l'enzyme est ainsi protégée des agressions des diverses molécules peu polaires présentes dans le réacteur, avec la création d'une zone tampon moins concentrée en substrats. Par ailleurs, la chute de  $V_i(sp)$  due à l'inhibition par le BzOH est plus faible en présence de 500 mg d'eau/l.

Avec 185 mM de MeOH, l'inhibition par le BzOH disparaît, du moins jusqu'à 160 mM de BzOH. La  $V_i(sp)$  augmente avec la concentration en BzOH. Pour observer l'inhibition par l'acide benzoïque, il faut donc travailler avec des concentrations en MeOH



faibles. Il faut noter cependant que la valeur de la vitesse est beaucoup plus faible en utilisant des concentrations en MeOH plus élevées.

#### C.3.3.4. Influence de la concentration en méthanol en présence d'eau

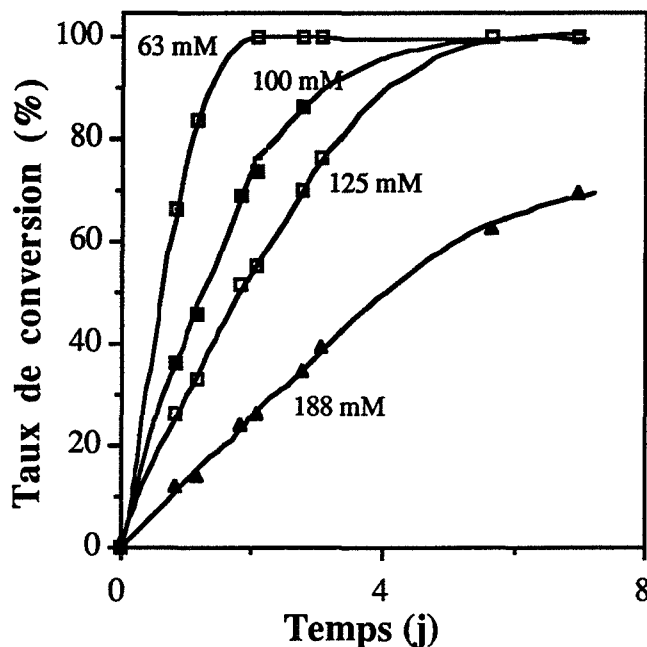


Figure C.3.3.4.a : Effet de la concentration en méthanol sur l'estérification.

[BzOH] 50 mM, hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l, eau ajoutée 500 mg/l.

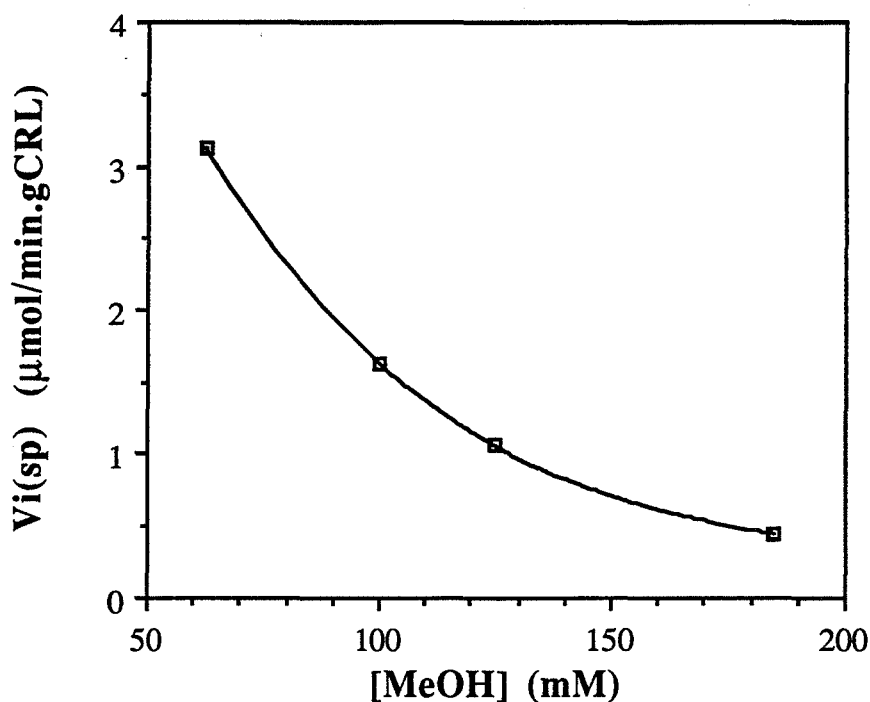


Figure C.3.3.4.b : Effet de la concentration en méthanol sur la Vi(sp) de réaction.

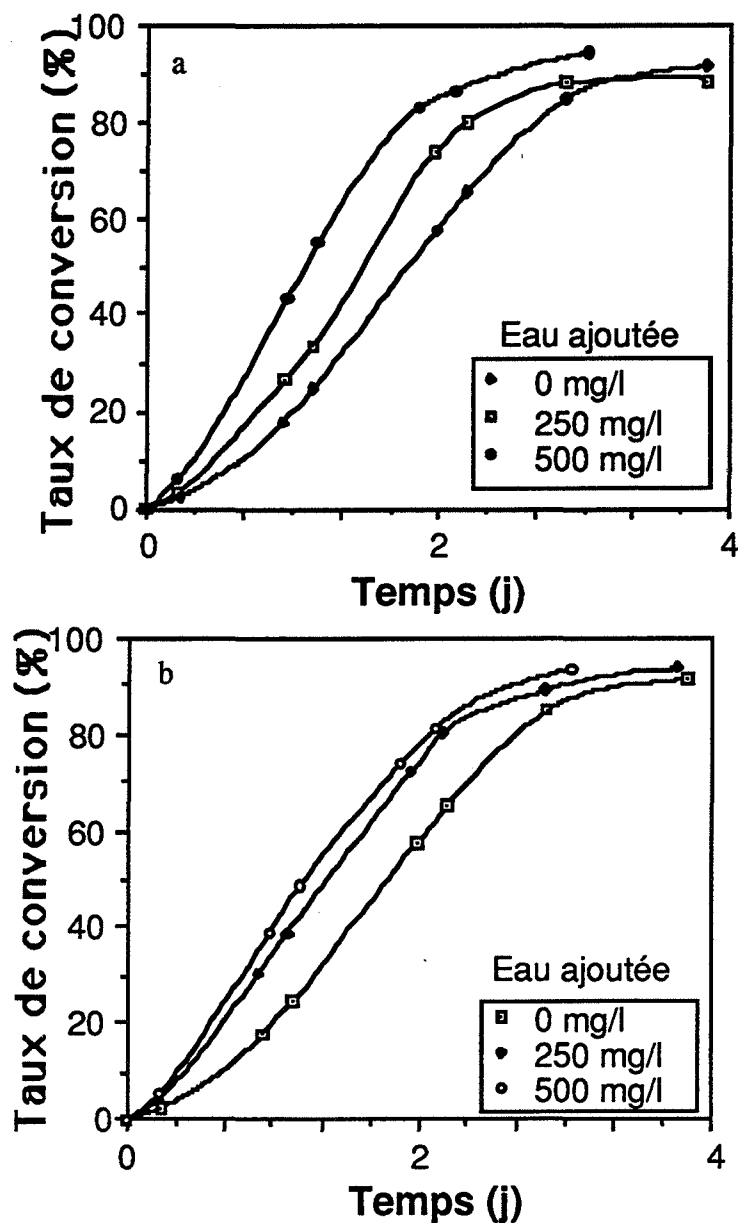
[BzOH] 50 mM, hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l, eau ajoutée 500 mg/l.

En ajoutant 500 mg d'eau/l, l'inhibition par le méthanol se manifeste avant des concentrations de 63 mM (Figures C.3.3.4.a et C.3.3.4.b). L'apport d'eau, par addition directe ou par saturation du toluène, amène à des différences de comportements de ce système catalytique vis-à-vis du méthanol (cf paragraphes C.3.1.4. et C.3.2.2.). Aucune explication simple ne permet d'expliquer totalement ce phénomène. Cependant, l'inhibition par le méthanol est à mettre en parallèle avec la quantité d'eau dans le milieu. Pour pouvoir comparer ces résultats, il faudrait se placer dans des conditions similaires de concentrations en acide benzoïque et de proportions de chaque solvant.

#### C.3.3.5. Influence de la fraction volumique de toluène pour différents ajouts d'eau

Jusqu'à présent, le mélange hexane/toluène a été utilisé en proportion équivolumique. Or, il a déjà été remarqué dans le paragraphe C.3.1.3. que le toluène agit sur la réaction. Il est donc intéressant d'étudier l'influence du rapport volumique toluène/hexane sur la cinétique de réaction. La proportion de toluène, solvant moins hydrophobe que l'hexane, modifie la répartition de l'eau dans le système. C'est pourquoi cette étude va prendre en compte ce paramètre en travaillant avec 3 teneurs en eau différentes : 0, 250 et 500 mg/l. La teneur en eau modifie profondément la cinétique quelle que soit la proportion en solvants (Figures C.3.3.5.a et C.3.3.5.b). Ainsi, en ajoutant plus d'eau, le "temps de latence" des courbes autocatalytiques diminue et tend à disparaître. Pour une teneur en eau de 500 mg/l, ce temps de latence est quasiment nul. Ceci confirme que l'aspect sigmoïdal des courbes de taux de conversion en fonction du temps est dû à un manque d'eau au niveau des sites catalytiques.

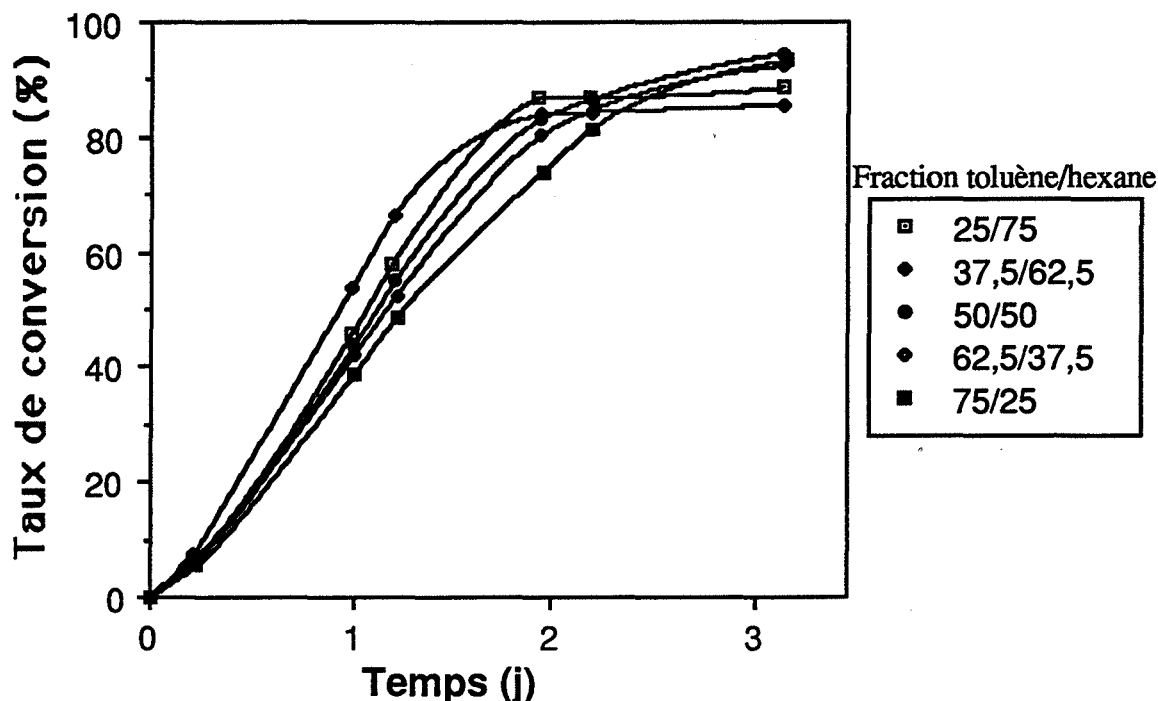
L'allure de la cinétique dépend non seulement de la teneur en eau dans le milieu mais également de la proportion de toluène dans le milieu organique, c'est-à-dire de l'hydrophobie du milieu organique (Figure C.3.3.5.c). Ainsi, la réaction est plus rapide avec des milieux pauvres en toluène et une teneur en eau importante. En effet, l'équilibre thermodynamique de la réaction est déjà atteint après 2 j pour des rapports 25/75 et 37,5/62,5, alors que, pour des rapports plus importants, l'estérification n'est pas terminée après 3 j de réaction.



**Figures C.3.3.5.a et C.3.3.5.b :** Evolution de la réaction en fonction de la quantité d'eau ajoutée pour un rapport volumique toluène/hexane 50/50 (a) et 75/25 (b).

*[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, CRL 10 g/l, le toluène et l'hexane sont saturés en eau.*

Par contre, les taux de conversion finaux, même s'ils sont atteints plus tardivement, sont plus élevés lorsque le milieu contient plus de toluène (Figure C.3.3.5.c). Avec une teneur en eau de 500 mg/l, ils sont inférieurs à 90% pour des rapports toluène/hexane inférieurs à 50/50 et supérieurs pour des rapports plus élevés. Le partage des substrats et produits entre les différentes phases est plus favorable pour la position de l'équilibre de la réaction lorsque le milieu contient un rapport en toluène important.



**Figure C.3.3.5.c :** Evolution des taux de conversion en fonction de la proportion volumique de toluène pour une teneur en eau de 500 mg/l.

*Conditions identiques aux Figures C.3.3.5.a et C.3.3.5.b.*

Etant donné l'allure autocatalytique des courbes d'évolution du taux de conversion en fonction du temps, il semble plus approprié de suivre la vitesse maximale spécifique  $V_{\max}(\text{sp})$  en fonction de la proportion volumique de toluène (Figure C.3.3.5.d).  $V_{\max}(\text{sp})$  est la vitesse maximale obtenue au cours de la réaction.

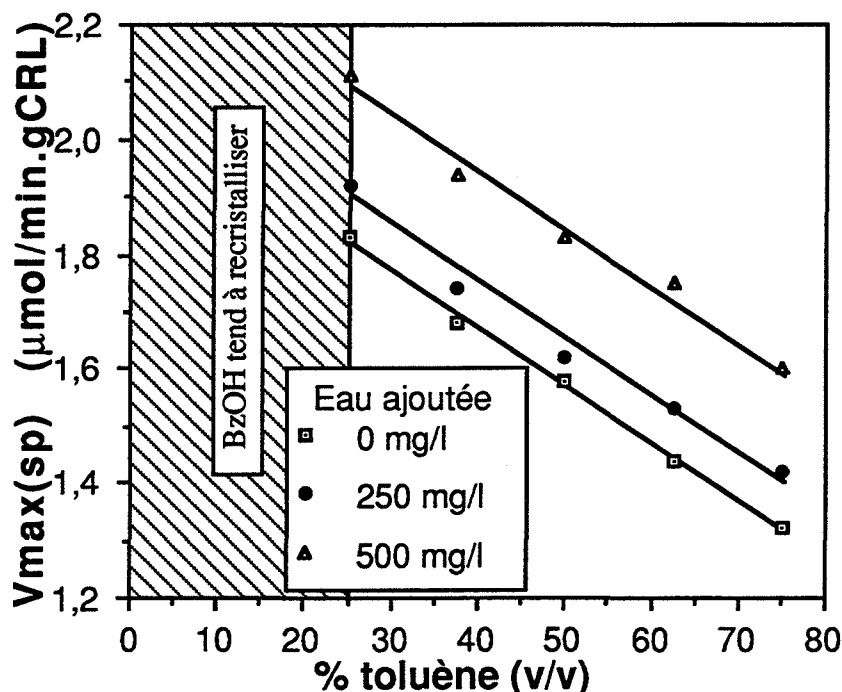
Il faut, tout d'abord, noter que la zone hachurée de la Figure C.3.3.5.d correspond à une partie instable du système, où BzOH tend à précipiter. Cette recristallisation dépend de nombreux paramètres telles que la concentration en MeOH, la teneur en eau et la proportion de toluène. Ainsi, il est difficile d'obtenir un essai fiable dans cette partie de la courbe, pour des proportions en toluène inférieures à 25%, car les taux de conversion sont estimés à partir de la quantité de BzOH effectivement en solution.

Dans la zone de travail, la  $V_{\max}(\text{sp})$  décroît proportionnellement au pourcentage volumique de toluène, et ceci indépendamment de la teneur en eau dans le système puisque les pentes des droites sont quasi identiques. L'augmentation de la teneur en eau n'agit que sur la valeur de  $V_{\max}(\text{sp})$ . Par conséquent, outre le fait que le toluène peut désorber l'eau de la surface de la CRL, la proportion de toluène agit sur la réaction elle-même en modifiant le coefficient de partage  $P$  des différents composés, particulièrement celui de BzOH qui passe de 0,19 dans l'hexane pur à 2,63 dans le toluène pur (Halling 1989b). Le coefficient de partage de BzOH dans le système toluène/eau a été déterminé au laboratoire et est égal à

9,65. Cette valeur est très supérieure à la valeur de Halling. P représente le rapport des concentrations du composé entre un solvant organique et l'eau :

$$P_{\text{BzOH}} = \frac{[\text{BzOH}]_{\text{solvant organique}}}{[\text{BzOH}]_{\text{eau}}}$$

Ceci se traduit par une augmentation de la concentration en BzOH dans la phase organique lorsque le rapport toluène/hexane augmente, et donc une baisse de la concentration en BzOH dans la couche aqueuse. Cette concentration locale plus faible dans la phase aqueuse est moins favorable à la cinétique de formation de BzOMe, car la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme dépend de la concentration en BzOH en contact direct avec la CRL.



**Figure C.3.3.5.d :** Influence de la proportion de toluène dans le milieu organique sur la vitesse maximale spécifique  $V_{\text{max}}(\text{sp})$  pour différentes teneurs en eau.

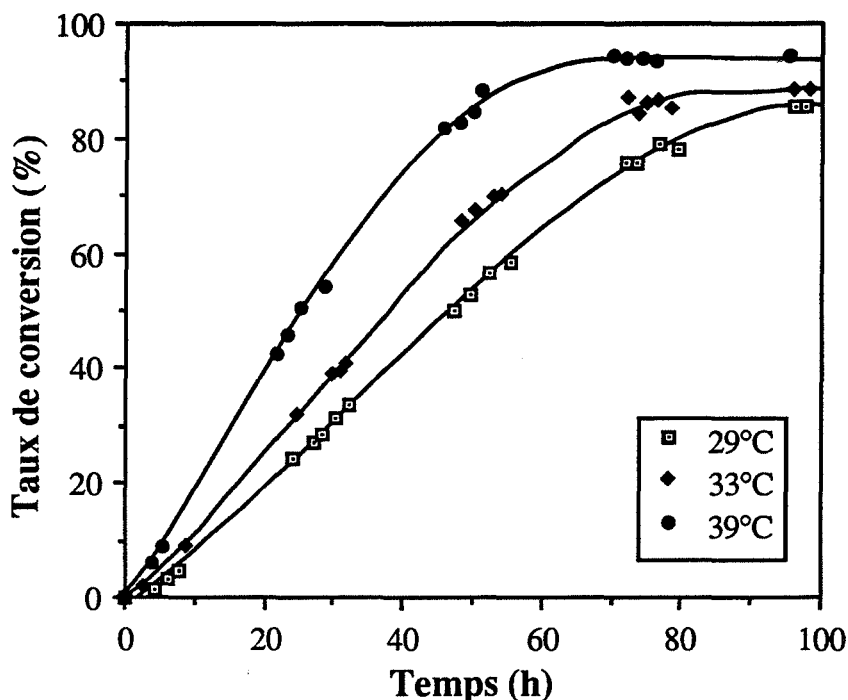
Mêmes conditions que les Figures C.3.3.5.a et C.3.3.5.b.

Par conséquent, le toluène, qui est nécessaire à la solubilisation de BzOH, agit défavorablement sur la cinétique d'estérification en diminuant la concentration locale de BzOH dans la phase aqueuse. La réaction est de ce fait plus lente. Par contre, le taux de conversion maximal est plus élevé dans des mélanges riches en toluène (supérieurs à 50/50), même si l'équilibre est plus long à atteindre.

### C.3.3.6. Influence de paramètres physiques en présence d'eau

#### C.3.3.6.1. La température

La température est un des paramètres physiques influençant les réactions enzymatiques (Figure C.3.3.6.1.a). Une étude complète n'a pas pu être réalisée car la gamme de températures autorisée par la hotte d'incubation ne permet la régulation que dans une plage restreinte de températures comprise entre la température ambiante et 40°C.



**Figure C.3.3.6.1.a :** Influence de la température sur l'évolution de la réaction.

*[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l, eau 500 mg/l, 220 tr/min.*

Dans cette gamme, l'augmentation de la température est favorable à la fois pour la cinétique de réaction et le taux de conversion final. Ainsi, la  $V_{max}(sp)$  augmente linéairement et passe de 0,98 à 1,67  $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$  en augmentant la température de 10°C (de 29 à 39°C) (Figure C.3.3.6.1.b). Il est donc préférable de travailler à 39°C pour obtenir une meilleure vitesse de réaction. De même, l'estérification a atteint plus rapidement son équilibre thermodynamique à 39°C (après 60 h) qu'à 29°C (après 96 h), avec un taux de conversion encore plus favorable, respectivement 94 et 85%.

Pour des raisons techniques, il est difficile de maîtriser la température au-dessus de 37°C. Par conséquent, cette température a été choisie comme température de travail.

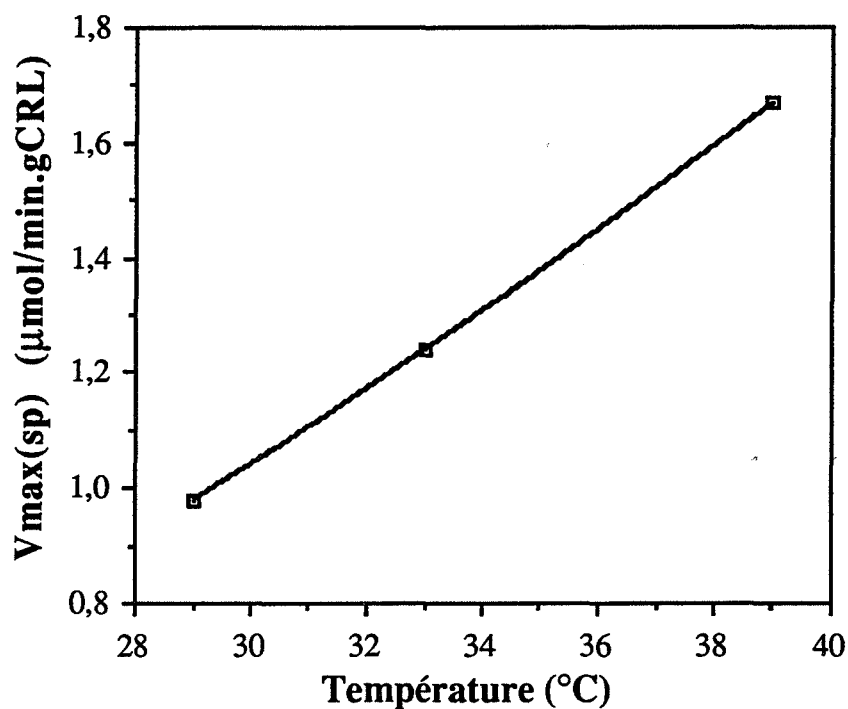


Figure C.3.3.6.1.b : Influence de la température sur la Vi(sp).

Mêmes conditions que la Figure C.3.3.6.1.a.

#### C.3.3.6.2. La vitesse d'agitation

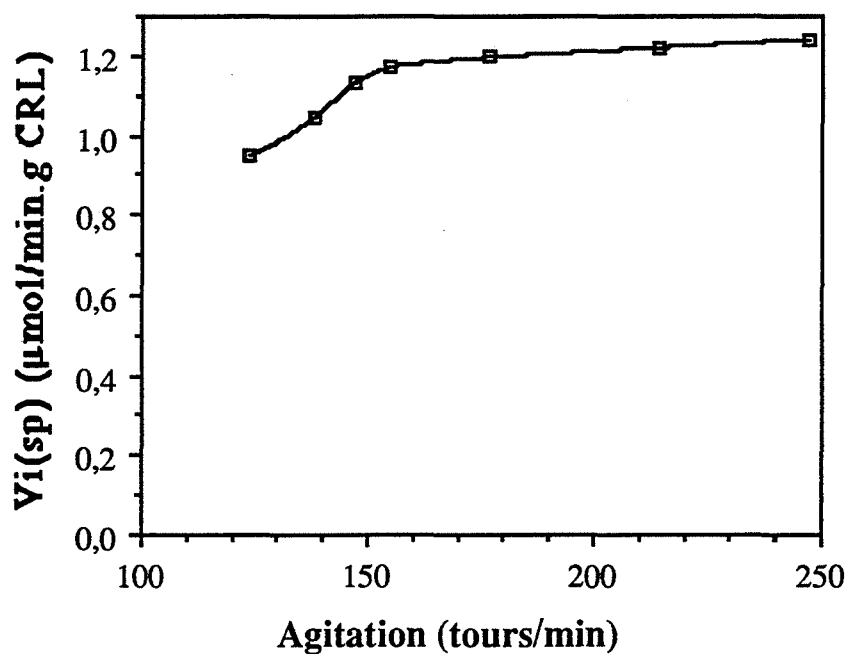


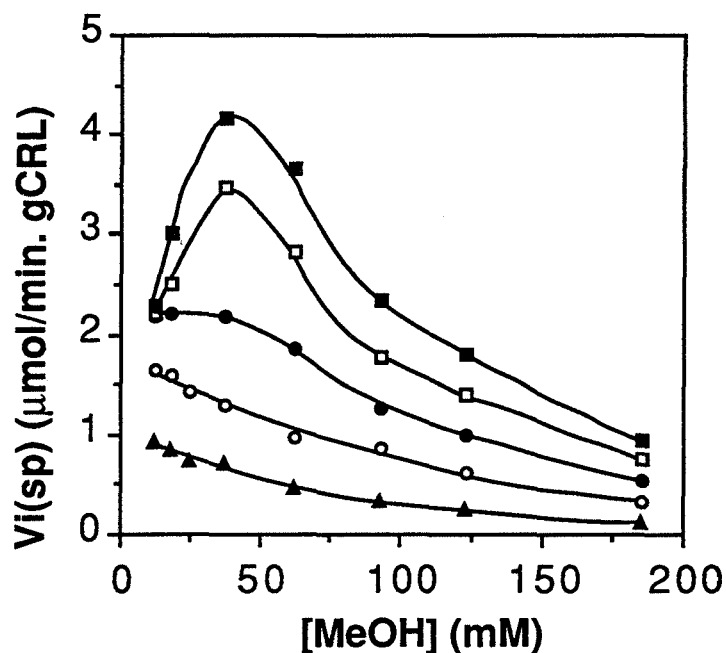
Figure C.3.3.6.2.a : Effet de la vitesse d'agitation sur la Vi(sp).

[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, hexane/toluène saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l, eau 500 mg/l, 37°C.

Dans les systèmes catalytiques hétérogènes solide-liquide, l'agitation permet un meilleur contact entre la poudre catalytique et les substrats à transformer, en favorisant la diffusion des substrats et des produits à travers la couche d'eau et en redistribuant l'eau formée sur toute la surface de la poudre. En faisant varier la vitesse d'agitation, entre 125 et 250 tours/min, deux zones peuvent être distinguées (Figure C.3.3.6.2.a). Avant 150 tours/min, la  $V_i(sp)$  est dépendante de la vitesse d'agitation et décroît rapidement de 1,2 à 0,9  $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$  en diminuant la vitesse de 150 à 125 tours/min. Au-delà, la vitesse d'agitation n'affecte quasiment pas la  $V_i(sp)$ . La vitesse de 220 tours/min, qui avait été choisie jusqu'à maintenant, était donc un choix judicieux puisqu'une petite variation de vitesse autour de 220 tours/min n'a pas de conséquence sur  $V_i(sp)$ . C'est pourquoi cette vitesse d'agitation sera gardée tout au long de ce travail.

### C.3.3.7. Influence des concentrations en substrats

Une étude cinétique a été entreprise pour, d'une part, poursuivre l'étude de l'influence de la concentration en substrats et, d'autre part, essayer de modéliser la vitesse initiale (Figures C.3.3.7.a et C.3.3.7.b).



**Figure C.3.3.7.a :** Evolution de la  $V_i(sp)$  en fonction de la concentration en MeOH pour différentes concentrations en BzOH.

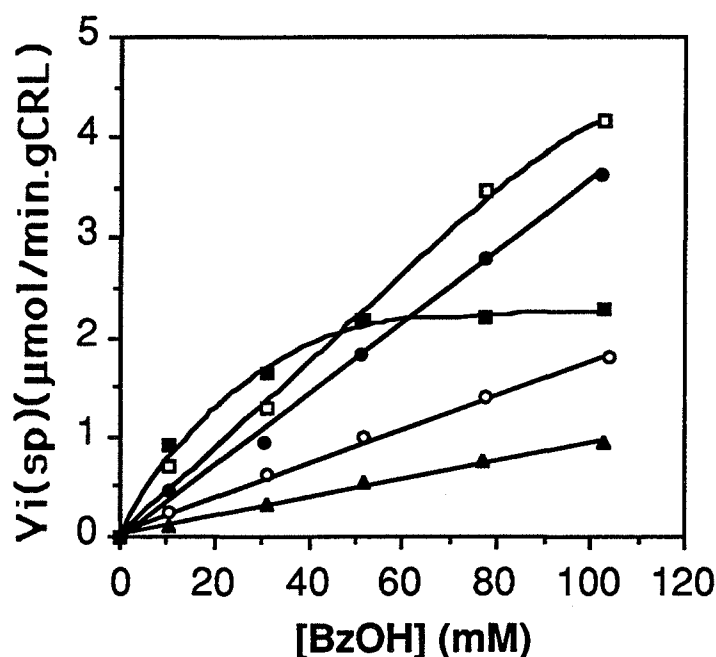
Concentrations en BzOH : ( $\blacktriangle$ ) 10 mM, ( $\circ$ ) 31 mM, ( $\bullet$ ) 52 mM, ( $\square$ ) 77 mM et ( $\blacksquare$ ) 103 mM.

CRL 10 g/l, hexane/toluène saturés en eau 50/50, eau 500 mg/l.

Les résultats obtenus confirment les conclusions précédentes avec les plans d'expériences. En effet, le MeOH inhibe la lipase à des concentrations faibles. Par contre,



BzOH, pour des concentrations inférieures à 100 mM, n'est pas inhibiteur de la réaction, et ceci quelle que soit la concentration en MeOH (Figure C.3.3.7.b). Pour des concentrations importantes (77 et 103 mM de BzOH), il semble même protéger la CRL de l'inhibition par le MeOH, et une  $V_i(sp)$  optimale est obtenue pour 37 mM de MeOH (Figure C.3.3.7.a). De nombreux travaux mettent en avant la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme qui protège l'enzyme de l'inhibition par l'alcool (Chulalaksananukul 1992). Dans notre cas, il se peut aussi que le méthanol se répartisse différemment entre les différentes phases. En particulier, la concentration en BzOH dans le réacteur agit directement sur la répartition du MeOH entre les phases organique et enzymatique. Si l'augmentation de la concentration en BzOH aboutit à une diminution locale de la concentration en MeOH dans la pellicule d'eau, ceci peut se traduire par une inhibition plus faible de la CRL par le MeOH.



**Figure C.3.3.7.b :** Evolution de  $V_i(sp)$  en fonction de la concentration en BzOH pour différentes concentrations en MeOH.

Concentrations en MeOH : (■) 12 mM, (□) 37 mM, (●) 62 mM, (○) 124 mM et (▲) 185 mM.

Mêmes conditions que la Figure C.3.3.7.a.

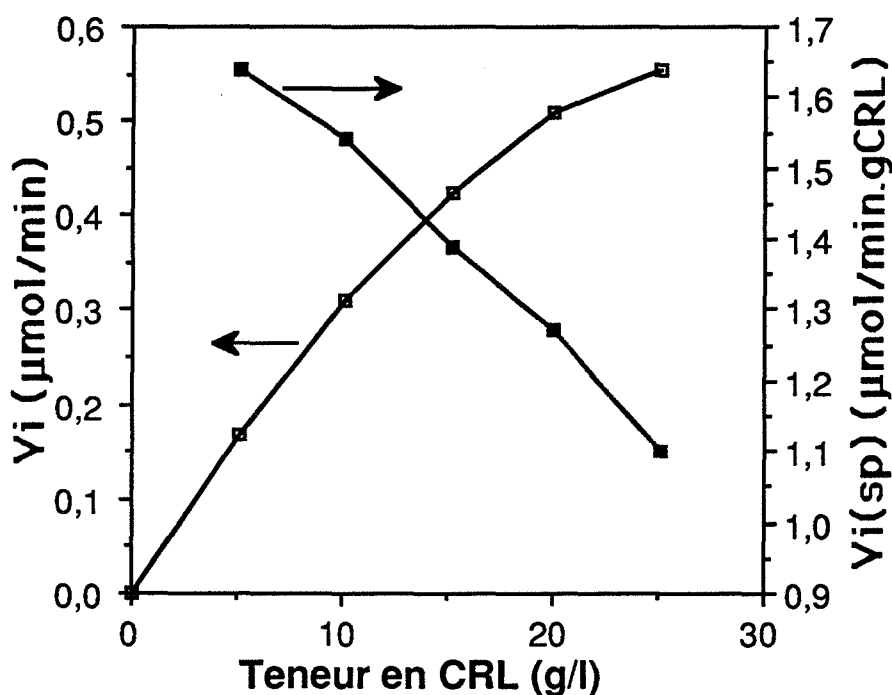
Aucun résultat concluant n'a pu être obtenu concernant la modélisation de cette réaction. Ceci vient sans doute du fait que le partage de l'eau dans le système n'est pas maîtrisé. En particulier, la variation de la quantité de MeOH dans le réacteur modifie grandement le partage de l'eau entre les phases enzymatique (pellicule d'eau) et organique. En effet, il a été démontré, en parallèle, que le MeOH interagit avec l'eau adsorbée par la poudre catalytique (cf paragraphe C.3.4.1.). De même, il est impossible par la méthode employée pour pré-équilibrer les différentes phases, soit de saturer le MeOH en eau, soit de le pré-équilibrer à une activité en eau donnée, que ce soit le MeOH seul ou en mélange avec

les solvants, car il est totalement miscible à l'eau. Lors des essais de pré-équilibre du MeOH dans le mélange toluène/hexane, un second problème apparaît : le MeOH, pendant la phase de pré-équilibre, a tendance à s'évaporer.

Par conséquent, les modèles courants ne s'appliquent pas de manière simple à cette réaction, car ils ne prennent pas en compte cette interaction.

### C.3.3.8. Influence de la teneur en CRL

La teneur en CRL a un effet favorable sur  $V_i$  (Figure C.3.3.8.a). Cependant,  $V_i$  ne croît pas linéairement avec la quantité de CRL. Ceci revient à dire que toute la CRL n'est pas activée. En effet, jusqu'à présent, la même teneur en lipase avait été employée. Or, il a été remarqué qu'un minimum d'eau adsorbée sur la lipase est nécessaire pour obtenir une activité maximale (cf paragraphe C.3.3.1.). Pour 10 g/l, en particulier, il faut un ajout d'eau minimum de 1000 mg/l pour avoir une vitesse initiale optimale. Dans les conditions opératoires de la Figure C.3.3.8.a, un ajout d'eau constant, correspondant à une teneur en eau globale de 1000 mg/l, a été fixé. Par conséquent, au-delà de 10 g de CRL/l, la quantité d'eau ajoutée n'est plus optimale et la pente de la courbe  $V_i$  en fonction de la teneur en CRL chute. Ceci est particulièrement visible en travaillant avec la vitesse initiale spécifique  $V_i(sp)$ , puisqu'elle représente la vitesse initiale relative à la quantité de CRL.

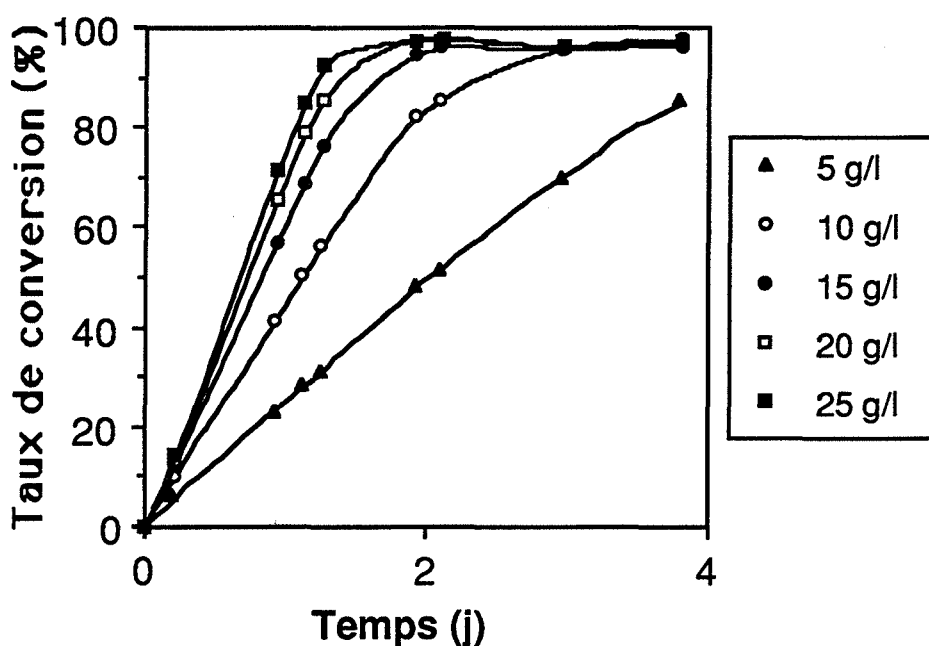


**Figure C.3.3.8.a :** Influence de la quantité de CRL sur la cinétique de réaction.

*[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50, eau 1000 mg/l.*

Ainsi, la chute de  $V_i(sp)$  avec l'augmentation de la teneur en CRL est expliquée par un manque d'eau pour activer optimalement la poudre catalytique. Malgré une perte d'efficacité de chaque molécule de lipase, la réaction est plus rapide et atteint sa position d'équilibre (taux de conversion de 96%) après 1,4 j pour 25 g de CRL/l et seulement après 3,5 j avec 10 g/l. Avec 5 g de CRL/l, la réaction n'est pas finie après 3,8 j et seulement 87% de BzOH a été converti (Figure C.3.3.8.b).

Les résultats obtenus prennent donc en compte l'interaction teneur en CRL-teneur en eau totale. Pour étudier uniquement l'effet de la teneur en CRL sur la cinétique de réaction, il ne faut pas travailler à ajout d'eau constant mais à teneur en eau proportionnelle à la quantité de CRL. Ce point sera décrit dans le paragraphe C.3.4.2.

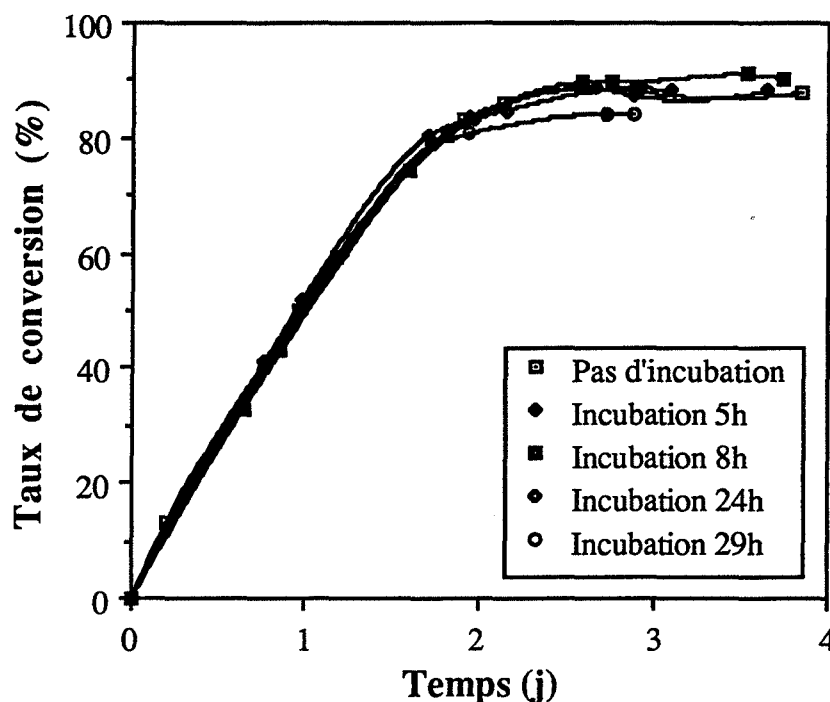


**Figure C.3.3.8.b :** Evolution des taux de conversion avec la teneur en CRL.  
*Mêmes conditions que la Figure C.3.3.8.a.*

#### C.3.3.9. Influence de la pré-incubation sur la stabilité de la CRL

La pré-incubation consiste à mettre en contact la CRL avec le mélange composé des solvants organiques, de BzOH et de l'eau pendant un temps défini dans les conditions de la réaction (température et agitation). Le temps de pré-incubation n'a pas d'effet sur la stabilité de la CRL car toutes les courbes sont similaires (Figure C.3.3.9.a). Ainsi, les solvants, la présence d'eau et de BzOH, la température et l'agitation orbitale ne modifient pas l'activité enzymatique de la CRL. Ceci indique qu'ils n'agissent pas sur la conformation de la CRL et ne dénaturent pas la lipase. Il faut tout de même noter que la pré-incubation est réalisée en l'absence de MeOH, car celui-ci permet de démarrer la réaction. Or ce dernier, comme il a déjà été remarqué à plusieurs reprises, est inhibiteur de la CRL.

D'après ces résultats, il n'est donc pas intéressant de pré-incuber le système puisque le système catalytique se comporte de la même manière. Après 29 h de pré-incubation, l'activité catalytique de la CRL est identique à celle obtenue sans pré-incubation.



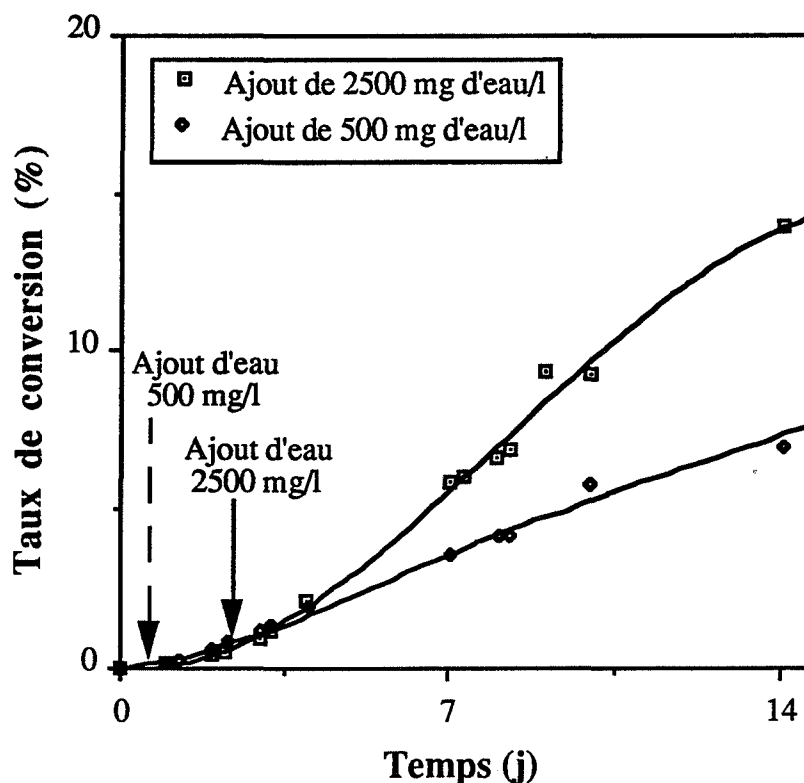
**Figure C.3.3.9.a :** Influence du temps d'incubation de la CRL en présence de BzOH dissous dans le mélange hexane/toluène.

*[BzOH] 50 mM, CRL 10 g/l, hexane/toluène saturés en eau 50/50, eau 500 mg/l, [MeOH] 62 mM, 220 tr/min, 37°C.*

#### C.3.3.10. Influence du conditionnement de la poudre catalytique

Après lyophilisation de la solution enzymatique, il n'y a plus assez d'eau pour observer l'estérification : un ajout d'eau pure est nécessaire pour activer la CRL (Figure C.3.3.10.a).

L'ajout de 2500 mg d'eau/l est réalisé en 3 étapes : 500 mg/l après 1 j de réaction, 1000 mg/l après 2 j de réaction et encore 1000 mg/l le troisième jour. Pour avoir des courbes plus faciles à comprendre, ces 3 ajouts sont regroupés en un seul ajout de 2500 mg/l (Figures C.3.3.10.a, C.3.3.10.b, C.3.3.10.c et C.3.3.10.d).

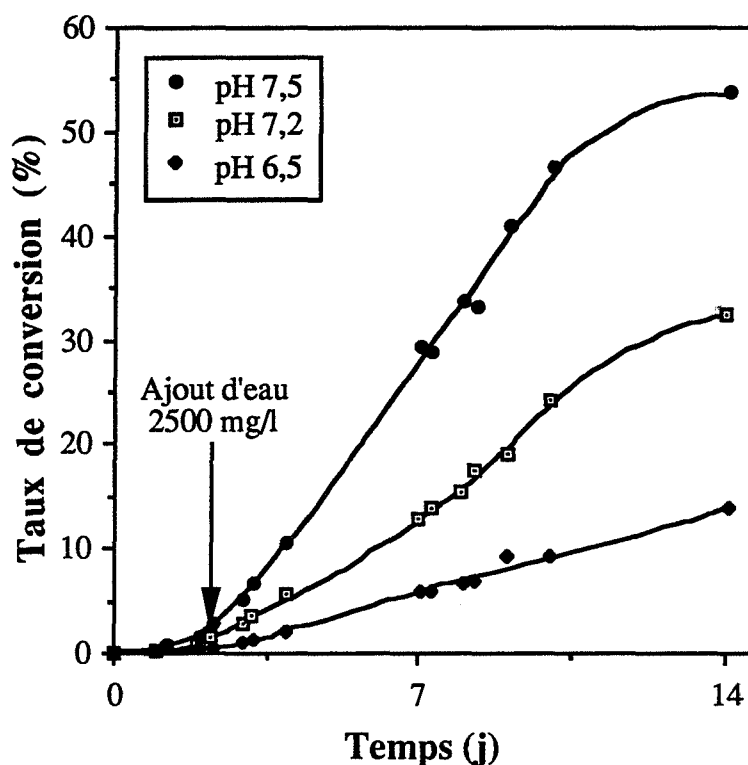


**Figure C.3.3.10.a :** Importance de l'ajout d'eau pour activer la CRL lyophilisée. *[BzOH] 51,2 mM, [MeOH] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50, CRL lyophilisée avec un tampon phosphate 100 mM de pH 7,2 (10 g de poudre brute/l).*

Sur la Figure C.3.3.10.a, l'ajout de 500 mg d'eau/l n'est pas suffisant pour activer complètement la lipase lyophilisée à pH 7,2 à l'aide d'un tampon phosphate 100 mM. Après un ajout total de 2500 mg/l, la vitesse de réaction augmente alors, mais cet apport ne semble pas encore suffisant pour activer la poudre lyophilisée. La réaction est très lente, et seulement 13% de l'acide benzoïque initial a été transformé après 14 j de réaction.

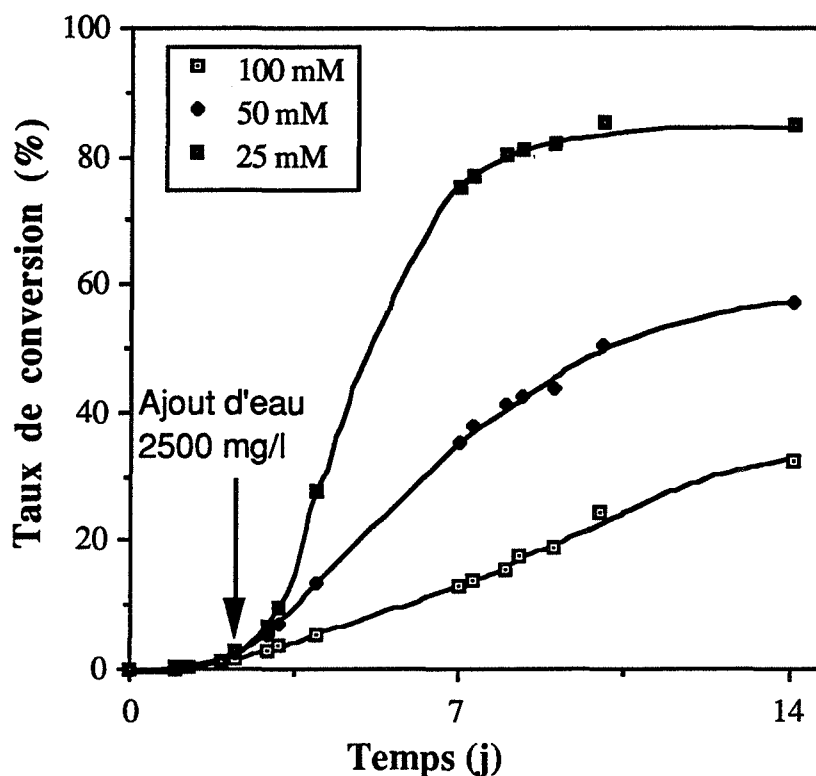
Hormis l'ajout d'eau, il est connu que le pH de lyophilisation de l'enzyme agit sur l'activité enzymatique : ce phénomène s'appelle mémoire pH (Zaks 1985). 3 pH ont été choisis pour illustrer ce phénomène (Figure C.3.3.10.b). D'après les courbes, il semblerait que la réaction est favorisée lorsque la CRL est lyophilisée à pH plutôt basique. Cependant, une partie de l'acide benzoïque précipite lorsque la CRL utilisée est lyophilisée à partir d'un tampon phosphate à pH 7,5. Or, le taux de conversion est calculé par rapport à la quantité de BzOH dissous. Avec une poudre lyophilisée à pH 7,5, seul 75% de l'acide benzoïque est réellement dissous dans le milieu organique. Le taux de conversion est donc surestimé. Cette précipitation est peut-être due à la formation de benzoate de sodium à partir de BzOH en milieu légèrement basique.

Il faut tout de même signaler que la réaction catalysée par la CRL lyophilisée est très lente, et que, dans le meilleur cas (pH 7,5), le taux de conversion atteint seulement 54% après 14 j de réaction.



**Figure C.3.3.10.b :** Influence du pH de lyophilisation sur la réaction d'estérification. *[BzOH] 51,2 mM, [MeOH] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50, CRL lyophilisée dans différents tampons phosphate 100 mM (CRL brute 10 g/l).*

Il semble également intéressant de déterminer l'influence de la concentration en tampon phosphate sur la réaction (Figure C.3.3.10.c). Le pH de lyophilisation de la CRL a été fixé à 7,2, car la recristallisation de BzOH n'a pas lieu dans ces conditions et c'est un pH déjà étudié (cf Figure C.3.3.10.a). Il semble que la concentration du tampon dans ces conditions doit être la plus faible pour avoir une meilleure cinétique de réaction. La présence de sels phosphate dans le réacteur doit sans doute perturber la répartition de l'eau entre les différentes phases. En effet, il est nécessaire d'ajouter une très grande quantité d'eau (au total 2500 mg/l) pour démarrer réellement la réaction. Des ajouts inférieurs sont insuffisants (ajouts progressifs chaque jour). Les sels phosphate sont en effet très avides d'eau.



**Figure C.3.3.10.c** : Influence de la concentration en tampon phosphate pH 7,2 sur l'activité enzymatique.

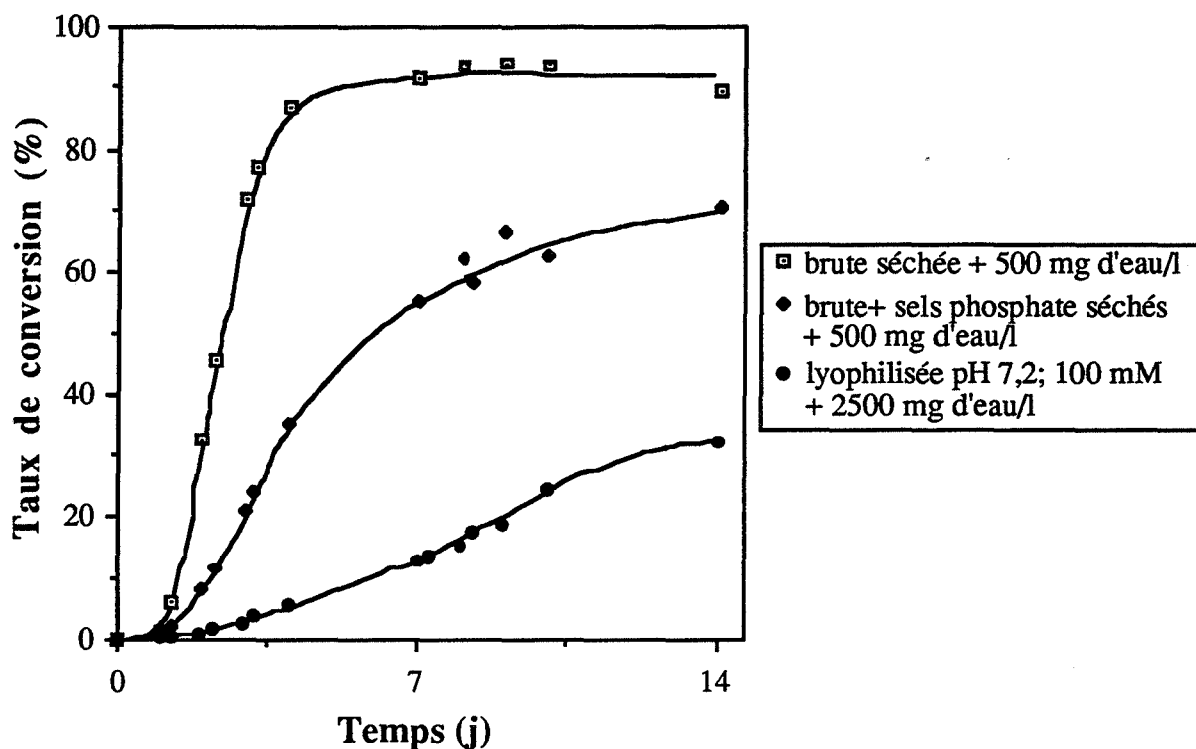
[BzOH] 51,2 mM, [MeOH] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50, CRL lyophilisée dans un tampon phosphate de pH 7,2 à différentes concentrations (CRL brute 10 g/l).

La présence d'une plus grande quantité de sels phosphate pendant la lyophilisation semble donc aussi participer à la perte d'activité enzymatique (Figure C.3.3.10.c). La perte d'activité est non seulement la conséquence d'un assèchement au niveau de la CRL à cause des sels phosphate mais également de l'étape de lyophilisation (Figure C.3.3.10.d). En effet, au lieu de lyophiliser la CRL dans le tampon phosphate, la CRL a été séchée dans le lyophilisateur en présence de sels phosphate en quantité équivalente à celle utilisée pour la lyophilisation. Dans ce cas, seulement 500 mg d'eau/l sont nécessaires pour activer le biocatalyseur, alors que la poudre lyophilisée nécessite 2500 mg/l. Les sels phosphate dans le lyophilisateur n'ont sans doute pas été séchés entièrement. L'aspect de la poudre au départ est différent. En particulier, le séchage en présence de sels ne modifie pas la poudre enzymatique et 2 phases solides peuvent être distinguées.

L'estérification avec la CRL séchée est beaucoup plus rapide qu'avec la CRL lyophilisée, même si cette dernière est en présence de 2500 mg d'eau/l.

La présence de sels phosphate ralentit la réaction et les taux de conversion ne dépassent pas 70% après 14 j de réaction, alors que plus de 90% de BzOH initial est converti après seulement 4 j avec la poudre brute séchée.

La quantité d'eau nécessaire à l'activation de la CRL est sans doute également proportionnelle à la quantité de sels phosphate présents dans la poudre lyophilisée, et dépend sans doute de la nature des sels. En pré-équilibrant la poudre lyophilisée en présence d'une atmosphère d'humidité connue, ceci permettrait d'éliminer peut-être certains artefacts dus à la différence d'humidité dans les poudres lyophilisées. Ceci sera développé dans le paragraphe C.3.4.3.



**Figure C.3.3.10.d :** Influence de la présence de sels phosphate et de la lyophilisation sur l'activité enzymatique.

*[BzOH] 51,2 mM, [MeOH] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50.*

*La CRL lyophilisée est obtenue à partir d'une solution tampon phosphate 100 mM à pH 7,2 (CRL brute 10 g/l).*

#### C.3.4. Introduction d'eau par pré-équilibrage à activité en eau donnée

Jusqu'à présent, l'ajout d'eau dans le système a été constant. Or, dans le cas où le paramètre étudié influe grandement sur la répartition de l'eau dans le système hétérogène, il vaut mieux travailler à ajout d'eau proportionnel aux facteurs affectant sa répartition dans le système. Ceci est particulièrement vrai pour étudier l'influence de la concentration en MeOH, de la teneur en CRL et la proportion de solvant dans le milieu organique. Un moyen de limiter ces interactions est de travailler à activité en eau fixée.



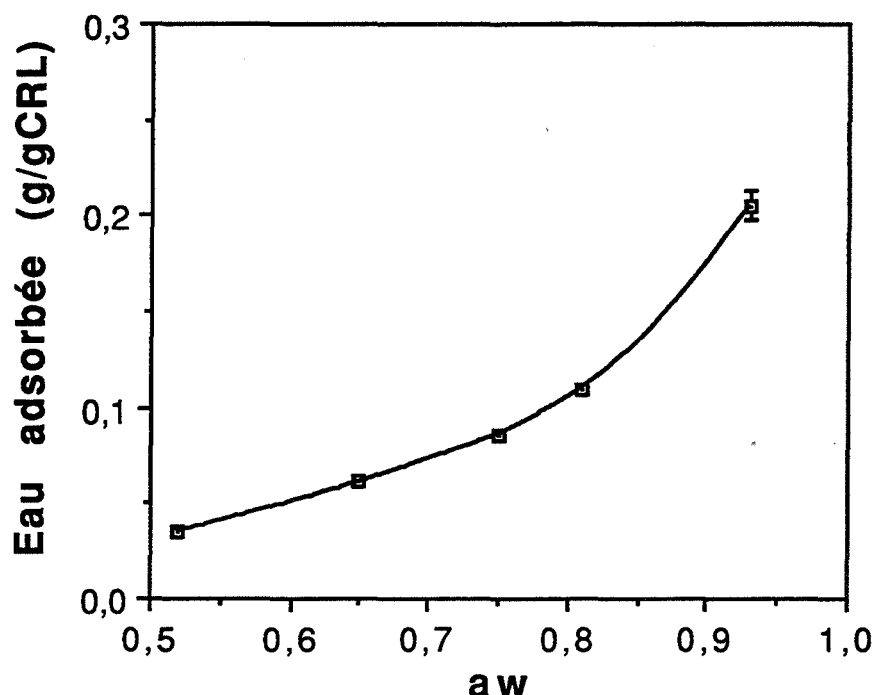


Figure C.3.4.a : Relation entre activité en eau  $a_w$  et eau adsorbée par la CRL.

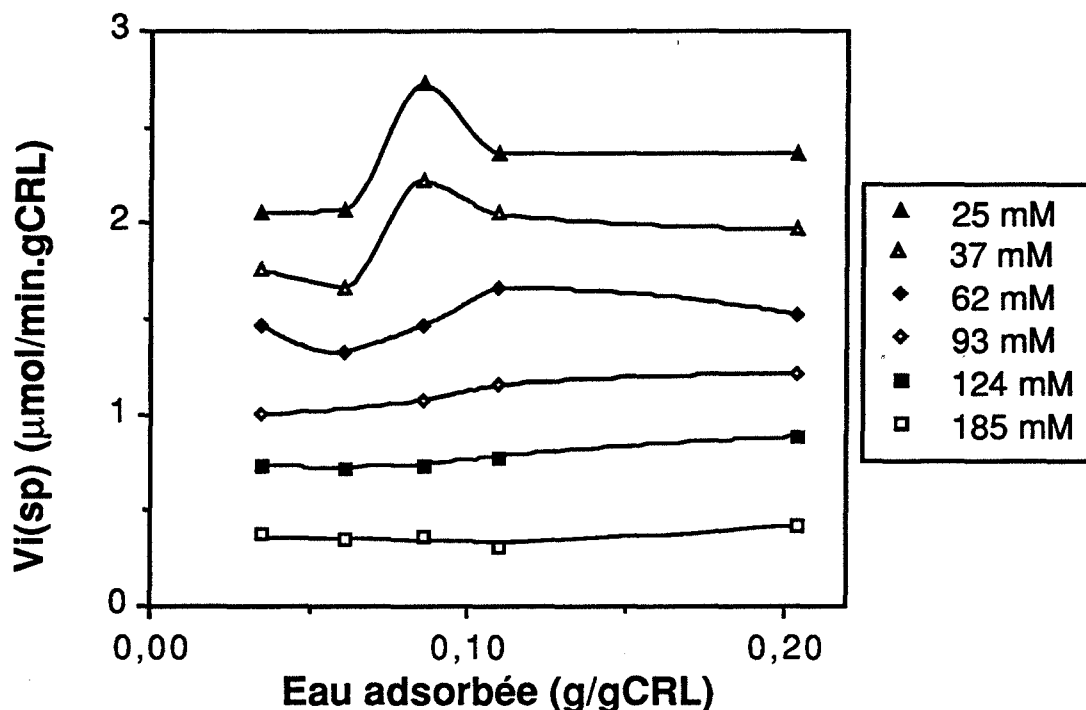
La quantité d'eau adsorbée par la CRL confinée dans une atmosphère de  $a_w$  connue est présentée dans la Figure C.3.4.a. Nous utilisons le terme  $a_w$  pour indiquer l'activité en eau de pré-équilibre de la CRL. Il faut noter que la quantité d'eau adsorbée par la poudre n'a pas de relation linéaire avec  $a_w$ .

Par ailleurs, cette étape montre une modification de la morphologie de la CRL surtout dans des atmosphères de forte  $a_w$ . En particulier, à  $a_w$  0,93, la poudre forme une pâte visqueuse, ressemblant à la morphologie de la poudre en fin de réaction lorsqu'une grande quantité d'eau est additionnée (cf paragraphe C.3.3.1.). En effet, la quantité d'eau présente dans les deux cas est du même ordre de grandeur. L'eau du système, c'est-à-dire l'eau ajoutée au départ et l'eau formée au cours de l'estérification, se retrouve majoritairement dans la phase catalytique en fin de réaction.

#### C.3.4.1. Influence de la concentration en MeOH sur la CRL pré-équilibrée à différentes activités en eau

Avec le méthanol, il est impossible par la méthode employée d'avoir un système où l'activité en eau ( $a_w$ ) du système est maîtrisée en début de réaction, car le méthanol est totalement miscible à l'eau et, donc, est difficilement pré-équilibrable à une  $a_w$  donnée. Des essais de pré-équilibre ont été réalisés avec le mélange méthanol-solvants organiques, mais, pendant cette étape, le MeOH a tendance à s'évaporer du mélange. C'est pourquoi, dans ce paragraphe, seule la CRL a été préalablement équilibrée à différentes  $a_w$ . Les

solvants organiques ont été utilisés saturés en eau pour éviter une autre interaction entre les solvants organiques et l'eau apportée par la CRL.



**Figure C.3.4.1.a :** Influence de l'eau adsorbée lors du pré-équilibrage de la CRL sur la  $V_i(sp)$  pour différentes concentrations en MeOH.

[BzOH] 50 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50, CRL brute avant pré-équilibrage 10 g/l.

Lors de l'étude cinétique (cf paragraphe C.3.3.7.), il a été remarqué que l'estérification de BzOH par le MeOH ne suit pas un modèle simple sans doute à cause de l'interaction entre le MeOH et l'eau adsorbée par la CRL. En effet, en étudiant simultanément ces deux paramètres, une interaction importante apparaît pour des concentrations en MeOH inférieures à 93 mM (Figure C.3.4.1.a). Celle-ci est la plus importante pour une quantité d'eau adsorbée de 0,8 g/gCRL, et donne alors une  $V_i(sp)$  maximale de 2,7  $\mu\text{mol/min.gCRL}$  pour 25 mM de MeOH. A partir de 93 mM en MeOH, cette interaction est faible et la  $V_i(sp)$  est quasiment constante quelle que soit la quantité d'eau préalablement adsorbée.

Or, pendant les plans d'expériences, la concentration en MeOH est toujours supérieure à 90 mM (cf paragraphe C.3.3.2.). Ceci explique en partie pourquoi l'addition d'eau, pendant les plans d'expériences, n'a pas d'effet sur la cinétique de réaction et qu'une interaction eau-MeOH négligeable a été mise en évidence. De même, lors de l'étude cinétique (cf paragraphe C.3.3.7.), la concentration en MeOH était comprise entre 12 et 185 mM, soit entre ces deux zones de comportement différents. De ce fait, la modélisation est très difficile car il faut prendre en compte cette interaction qui a lieu pour les faibles concentrations en MeOH.

C.3.4.2. Influence de la teneur en CRL pré-équilibrée à  $a_w$  0,65

Le pré-équilibrage de la poudre enzymatique à  $a_w$  0,65 correspond à 0,051 g d'eau adsorbée/gCRL. Cette valeur est inférieure à celle donnée sur la Figure C.3.4.a. En effet, il a été remarqué que la quantité d'eau adsorbée dépend du lot de poudre enzymatique utilisé. Or, dans la première série d'expériences, un nouveau lot de CRL a été utilisé, expliquant pourquoi la quantité d'eau adsorbée est légèrement différente.

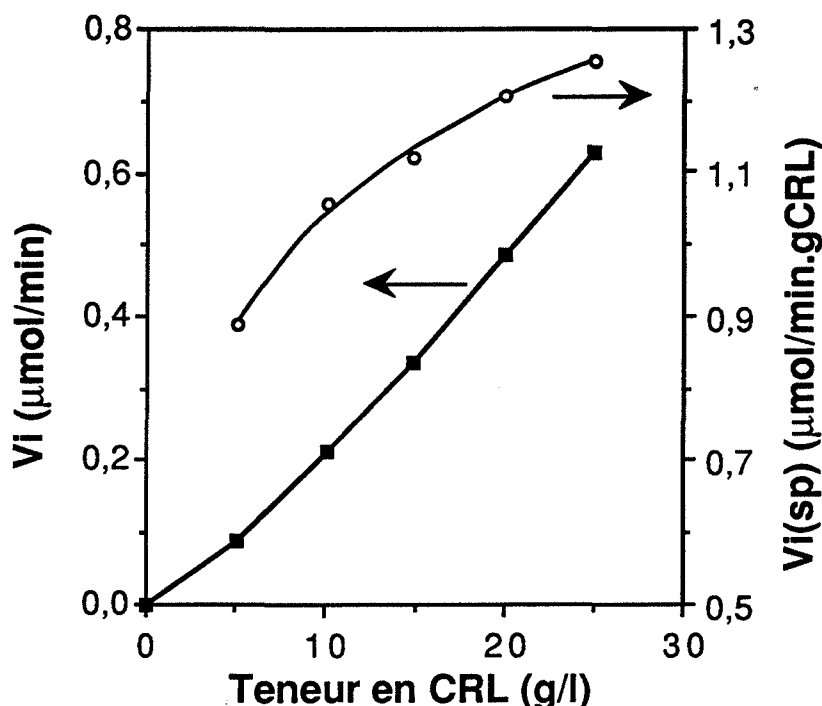


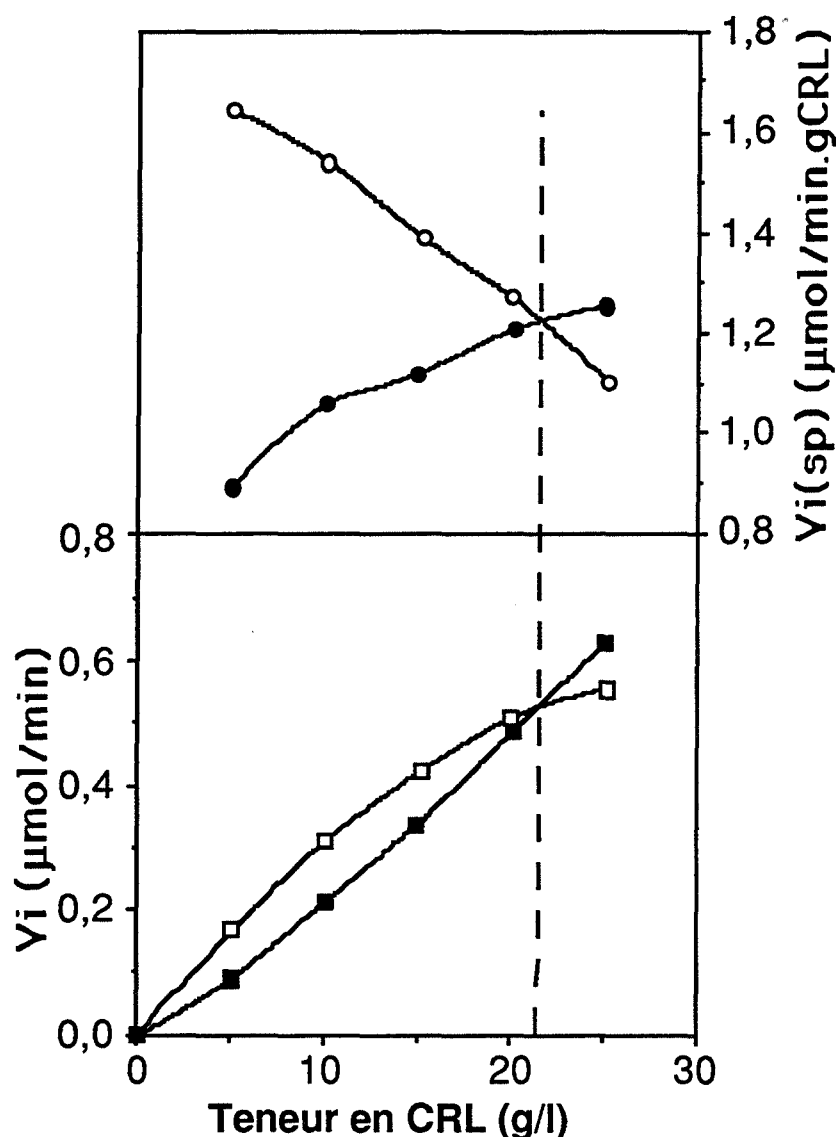
Figure C.3.4.2.a : Influence de la teneur en CRL pré-équilibrée à  $a_w$  0,65.

[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50.

En travaillant avec une quantité d'eau proportionnelle à la quantité de CRL, la  $V_i$  est alors quasi proportionnelle à la quantité de CRL (Figure C.3.4.2.a) pour une teneur en CRL comprise entre 10 et 25 g/l. Par contre entre 0 et 10 g/l, il n'y a plus linéarité. Ceci explique la rupture de pente observée pour  $V_i(sp)$  entre 5 et 10 g de CRL/l. Un apport d'eau proportionnel à la quantité de CRL permet ainsi d'observer réellement l'effet de la teneur en CRL sur la cinétique. Pour des teneurs inférieures à 10 g/l, il semble qu'une partie de la CRL n'est pas active. Or, il a déjà été remarqué que le MeOH se concentre préférentiellement dans la couche aqueuse entourant la CRL. En effet, le coefficient de partage du MeOH dans les systèmes toluène/eau et hexane/eau est respectivement égal à 0,0071 et 0,0016. Le MeOH se concentre donc majoritairement dans la couche aqueuse discrète. Ainsi, en augmentant la teneur en CRL et donc la teneur en eau dans le système, ceci revient à réduire l'extraction de la couche d'eau par le milieu organique contenant du MeOH et, de ce fait, diminuer la concentration en MeOH dans la pellicule aqueuse. En résumé, la concentration

locale en MeOH diminue dans la couche d'eau entourant la CRL, d'où une diminution relative de l'inhibition par le MeOH. Donc, la  $V_i(sp)$  augmente quasi linéairement car la concentration en MeOH relative à la quantité de CRL est plus faible.

Il est possible de comparer ce résultat avec ceux obtenus avec un ajout en eau constant de 1000 mg/l (cf paragraphe C.3.3.8). Ces courbes et celles obtenues avec un ajout constant de 1000 mg d'eau/l se coupent pour une teneur en CRL de 21 g/l (Figure C.3.4.2.b). Cette valeur correspond approximativement à la même quantité d'eau introduite par les 2 méthodes, soit 1000 et 1071 mg/l.



**Figure C.3.4.2.b :** Comparaison des deux méthodes d'ajout d'eau et effet de la teneur en CRL sur la cinétique de réaction.

Eau adsorbée proportionnelle à la teneur en CRL (0,051 g/gCRL) : (■)  $V_i$ , (●)  $V_i(sp)$ .

Eau ajoutée (1000 mg/l) : (□)  $V_i$ , (○)  $V_i(sp)$ .

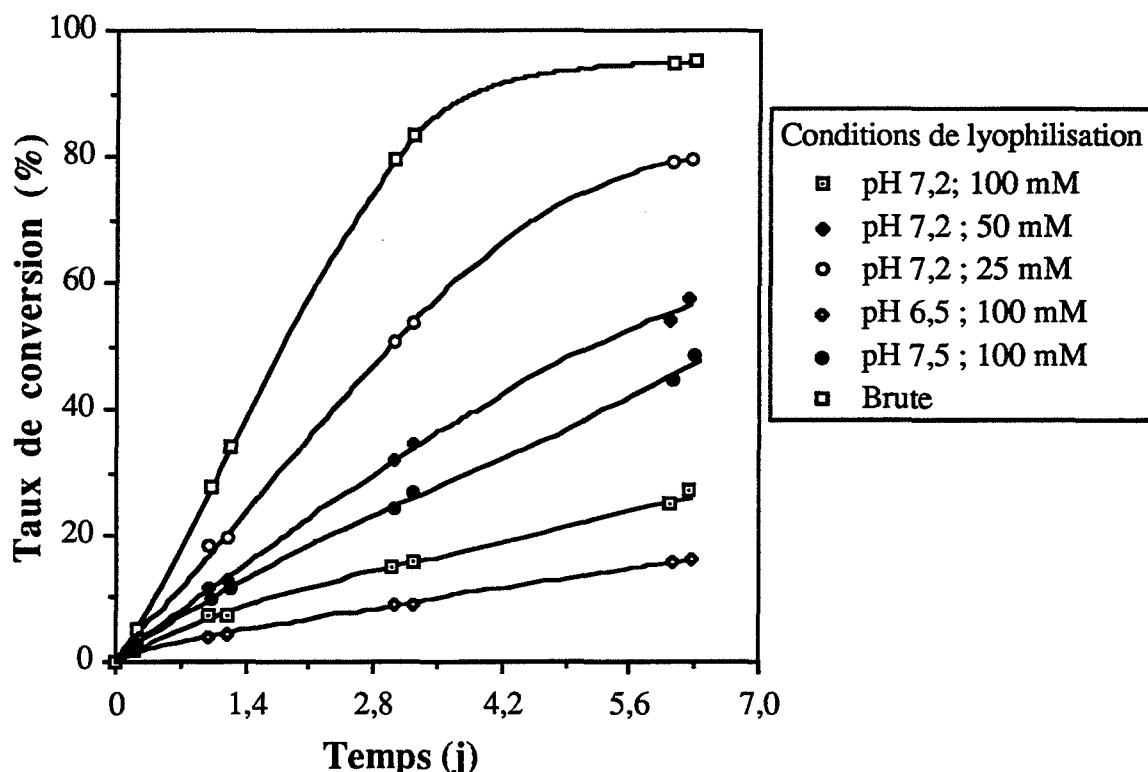
[BzOH] 50 mM, [MeOH] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50.

Ainsi, le comportement cinétique de la CRL dépend beaucoup de la quantité d'eau présente dans le milieu. En comparant les  $V_i$ , il semble que la poudre pré-équilibrée à  $a_w$  0,65 est moins efficace jusqu'à une teneur de 21 g/l. Mais ceci est uniquement la conséquence d'une plus faible quantité d'eau globale à l'intérieur du réacteur. Cette situation se renverse après l'intersection des deux courbes.

Un apport d'eau proportionnel à la CRL est donc préférable, car les artefacts dus à une variation de la quantité d'eau relative à la teneur en CRL sont éliminés. Cependant, d'autres interactions subsistent entre, d'une part, le MeOH et l'eau adsorbée et, d'autre part, le MeOH et la CRL, qui ne permettent pas de montrer l'influence pure de la CRL.

Il faudrait tout de même ajuster cet apport d'eau pour avoir une  $V_i(sp)$  maximale, ce qui n'est pas le cas ici pour les faibles teneurs en CRL (comparaison des  $V_i(sp)$  entre ajout constant et proportionnel).

#### C.3.4.3. Influence des conditions de lyophilisation sur la CRL pré-équilibrée à $a_w$ 0,65

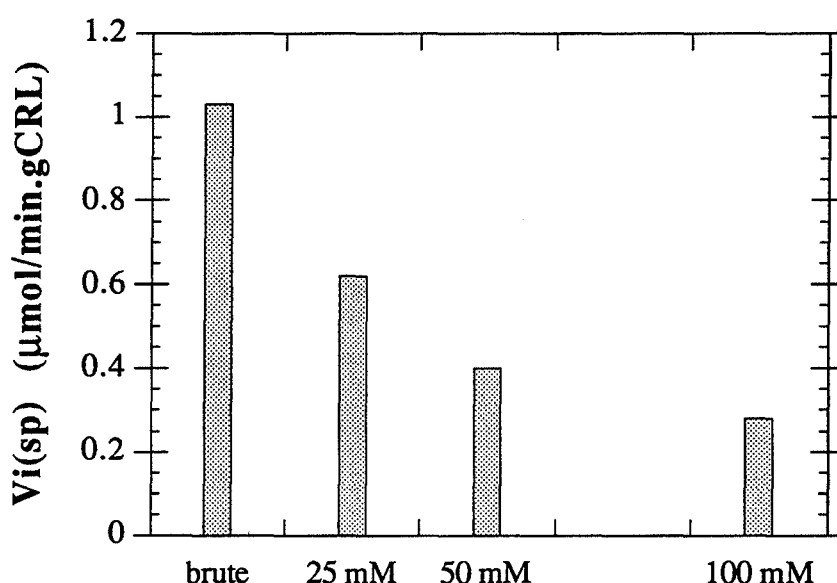


**Figure C.3.4.3.a :** Influence du conditionnement de la CRL sur la cinétique de réaction.  $[BzOH]$  51,2 mM,  $[MeOH]$  62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50. La poudre lyophilisée ou brute séchée est pré-équilibrée à  $a_w$  0,65.

La perte d'activité de la poudre lyophilisée est sans doute en partie due à l'étape de lyophilisation. Toutefois, sur la Figure C.3.4.3.a, il semble que le pH et la concentration en

sels phosphate affectent l'activité enzymatique. En effet, avec une concentration identique en sels de 100 mM lors de la lyophilisation, un pH légèrement basique (7,5) est plus favorable à la réaction. Ceci avait déjà été remarqué pour des ajouts constants (cf paragraphe C.3.3.10.). Cependant, la présence d'une grande quantité de sels modifie le système et le BzOH tend à précipiter ou former un sel de benzoate de sodium avec l'augmentation du pH. Ceci est particulièrement visible pour les concentrations de 100 mM, à pH 7,5 : les taux de conversion obtenus sont ainsi surestimés car calculés par rapport au BzOH dissous.

De toute manière, du moins à pH 7,2, il vaut mieux travailler avec un minimum de sels (25 mM) : la réaction est alors plus rapide. En augmentant la quantité de sels, la  $V_i(sp)$  chute rapidement (Figure C.3.4.3.b).



**Figure C.3.4.3.b** : Influence de la concentration en sels phosphate apportés par la lyophilisation à pH 7,2 sur la  $V_i(sp)$ .

[BzOH] 51,2 mM, [MeOH] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50, poudre lyophilisée ou brute séchée pré-équilibrée à  $a_w$  0,65.

Les sels phosphate servent de déshydratant et pompent sans doute une partie de l'eau formée. Pré-équilibrer à  $a_w$  0,65 la poudre lyophilisée n'est pas suffisant pour hydrater correctement les sels phosphate. La perte d'activité peut être en partie la conséquence d'une répartition de l'eau différente et en faveur des sels de phosphate. Les conclusions sont pourtant identiques, que ce soit à ajout d'eau constant ou après pré-équilibrage de la CRL lyophilisée. Il faut signaler que la présence de sels augmente considérablement l'adsorption d'eau pendant le pré-équilibrage : cette augmentation est proportionnelle à la nature et la quantité de sels présents. La quantité d'eau adsorbée lors du pré-équilibrage à  $a_w$  0,65 est présentée dans le Tableau C.3.4.3.

De même, la présence de sels affecte grandement la morphologie de la poudre : celle-ci a tendance à s'agréger plus rapidement et colle sur les parois du réacteur. A pH 7,5, la poudre lyophilisée forme des flocons.

Il peut être aussi remarqué que pré-équilibrer la poudre lyophilisée à  $a_w$  0,65 suffit à éliminer l'allure autocatalytique de la courbe taux de conversion en fonction du temps. En fait, à ajout d'eau constant de 2500 mg/l (voir paragraphe C.3.3.10.), les cinétiques sont autocatalytiques. En effet, un ajout d'eau de 2500 mg/l représente seulement 50 mg d'eau, soit environ la quantité d'eau adsorbée par la poudre lyophilisée avec un tampon phosphate 25 mM à pH 7,2 (Tableau C.3.4.3). C'est pourquoi seule la poudre lyophilisée à partir de cette solution tampon donne une courbe quasiment non sigmoïdale après un ajout d'eau de 2500 mg/l. Avec les autres poudres lyophilisées, l'ajout de 2500 mg/l, soit 50 mg d'eau, est fortement inférieur à la quantité d'eau adsorbée par la même poudre pré-équilibrée à  $a_w$  0,65. Ceci explique pourquoi les réactions sont plus rapides avec les poudres pré-équilibrées à  $a_w$  0,65.

Enfin, la réaction catalysée par la poudre lyophilisée donne des taux de conversion beaucoup plus faibles (Figure C.3.4.3.a). La présence de deux sels phosphate hydratés ou partiellement hydratés et en proportion variable est également connue pour modifier les vitesses de réaction (Kim 1995). Elle est sans doute aussi la cause du déplacement d'équilibre moins favorable à la réaction.

pH tampon	7,2	7,2	7,2	6,5	7,5	-
[Tampon] (mM)	25	50	100	100	100	-
Eau adsorbée (mg)	53	99,8	193,8	127,5	208,1	14,3

**Tableau C.3.4.3** : Quantité d'eau adsorbée sous atmosphère à  $a_w$  contrôlée de 0,65 ( $\text{NaNO}_2$ ) par la poudre lyophilisée à pH et concentration en tampon donnés.

Remarques : la dernière colonne correspond à l'adsorption de la poudre brute séchée préalablement dans le lyophilisateur. La masse de CRL brute initiale est de 200 mg pour chaque essai.

En conclusion, la lyophilisation de la CRL n'améliore pas la cinétique de réaction et la thermodynamique de la réaction. C'est une étape longue et coûteuse qui n'est pas nécessaire, car, d'une part, la poudre commerciale est un meilleur catalyseur de la réaction, et, d'autre part, les taux de conversion obtenus sont inférieurs. D'un point de vue scientifique, l'étape de lyophilisation et la présence de sels sont responsables de la perte d'activité enzymatique. Cependant, parmi les pH de lyophilisation étudiés, un pH légèrement basique est plus favorable à l'estérification. La concentration en tampon doit être, par ailleurs, la plus faible possible pour améliorer les cinétiques observées. Enfin, le pré-

équilibrage de la poudre enzymatique à  $a_w$  0,65 après lyophilisation permet d'éliminer la cinétique autocatalytique et d'obtenir un catalyseur identiquement hydraté.

#### C.3.4.4. Répétabilité de la réaction

Même si jusqu'à présent, de nombreux essais avaient été réalisés en double ou en triple, aucune étude de répétabilité n'a été présentée. Toutefois, il est important de s'assurer que la réaction est répétable, surtout lorsque la poudre enzymatique est pré-équilibrée. Ainsi, sur 6 essais réalisés avec une poudre pré-équilibrée à  $a_w$  0,65 (solution saturée de  $\text{NaNO}_2$ ), la quantité d'eau adsorbée est de  $0,061 \pm 0,001$  g/gCRL, soit une erreur de 1,9%. L'erreur sur les  $V_i(\text{sp})$  et taux de conversion, calculée à partir des 6 essais, est inférieure à 2% (1,8%). Les conditions de réaction sont par ailleurs identiques aux conditions de référence avec une teneur en CRL de 10 g/l (voir conditions de la Figure C.3.4.2.a).

La réaction est donc répétable avec une erreur moyenne inférieure à 2%.

#### C.3.4.5. Influence de la proportion de toluène dans le mélange hexane/toluène saturé en eau

En pré-équilibrant la CRL à  $a_w$  0,65, il est possible d'abaisser la limite où le BzOH a tendance à précipiter. Il est ainsi possible de travailler avec des proportions en toluène allant de 10 à 100% (v/v). En effet, cet apport d'eau supplémentaire améliore légèrement la solubilité de BzOH : la solubilité de BzOH dans l'eau à 40°C est de 6 g/l (The Merck Index 1989). Dans ces conditions, les cinétiques de réaction ne sont pas autocatalytiques et il apparaît un phénomène supplémentaire qui n'a pas été détecté dans le paragraphe C.3.3.5., car la limite de solubilité était beaucoup plus importante (valeur minimale de 25% en toluène). En effet,  $V_i(\text{sp})$  croît, dans un premier temps, linéairement entre 10 et 35% en toluène jusqu'à une valeur maximale de  $1,16 \mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$  (Figure C.3.4.5.a). A partir de cette valeur,  $V_i(\text{sp})$  diminue alors linéairement avec la proportion de toluène jusqu'à une valeur minimale de  $0,825 \mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$  dans du toluène pur. La décroissance de  $V_i(\text{sp})$  avec l'augmentation de la proportion de toluène a déjà été présentée et expliquée auparavant (cf paragraphe C.3.3.5.) : elle est liée principalement à la répartition défavorable de BzOH pour la couche aqueuse entourant la CRL.

Par contre, la baisse d'activité pour des valeurs inférieures à 35% en toluène peut être expliquée par le fait que la concentration en substrats, et plus précisément en BzOH, augmente de façon importante dans la couche aqueuse, et la CRL est alors inhibée par excès de BzOH. En effet, le coefficient de partage de BzOH devient plus favorable pour la phase aqueuse en travaillant avec un milieu organique riche en hexane (dans un système hexane

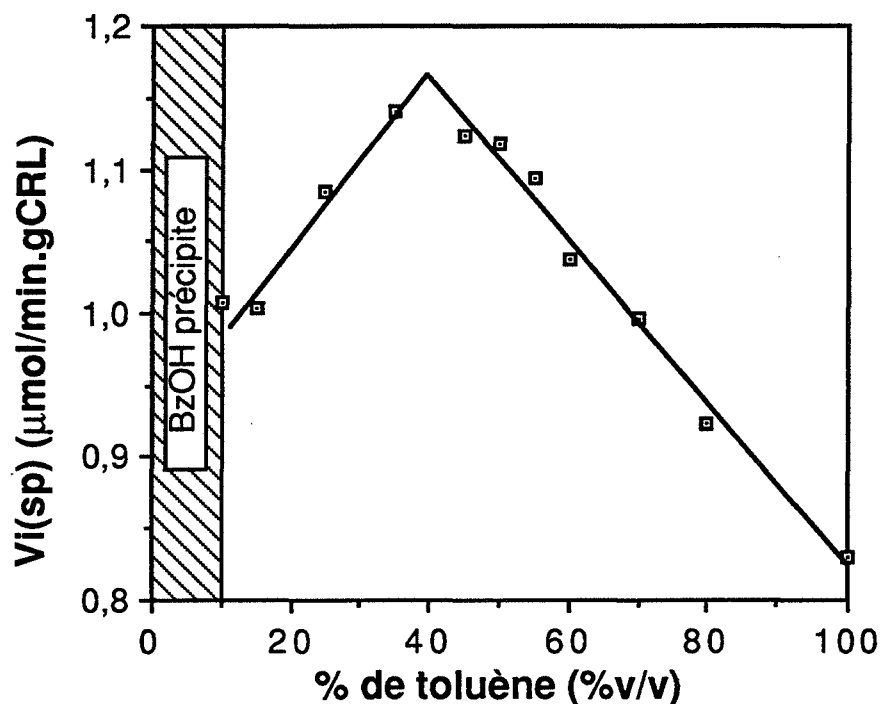


pur/eau,  $P$  est égal à 0,19). Ceci s'accroît avec la diminution de la quantité de toluène dans le milieu, jusqu'à la limite de solubilité de BzOH dans le système.

Certains préconisent d'utiliser le  $\log(P)_{\text{mélange}}$  plutôt que directement la proportion volumique du solvant, car ceci permet de prendre en compte la polarité du milieu organique (Laane 1987, Reslow 1987). Le  $\log(P)_{\text{mélange}}$  représente le logarithme du coefficient de partage théorique d'un mélange considéré comme une seule entité. Il se calcule à l'aide de la formule empirique suivante (Laane 1987) :

$$\log(P)_{\text{mélange}} = \sum_{i=1}^n x_i \cdot \log(P)_i$$

avec  $x_i$  fraction molaire du solvant  $i$ ,  $\log(P)_i$  logarithme du coefficient de partage du solvant  $i$  pur dans un système n-octanol/eau,  $n$  nombre de solvants dans le mélange.

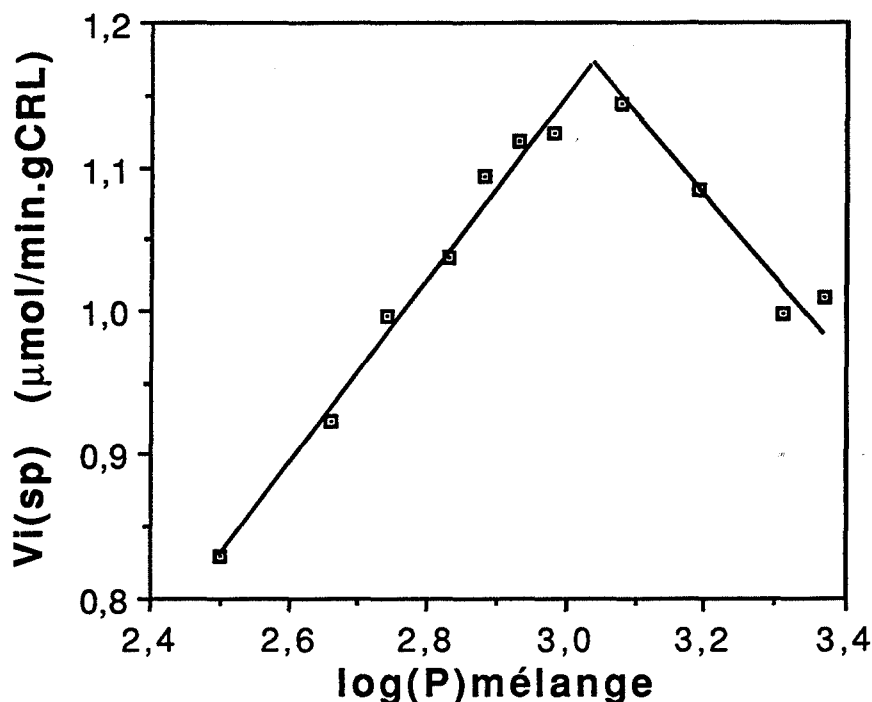


**Figure C.3.4.5.a :** Evolution de la vitesse initiale spécifique avec la proportion volumique de toluène dans le mélange toluène/hexane.

$[BzOH]$  50 mM,  $[MeOH]$  62 mM, CRL 10 g/l.

La CRL a été pré-équilibrée à  $a_w$  0,65 (eau adsorbée : 0,05 g/gCRL). Les solvants sont saturés en eau.

L'évolution de la  $V_i(sp)$  en fonction du  $\log(P)_{\text{mélange}}$  est présentée dans la Figure C.3.4.5.b. Dans notre cas, ceci n'apporte pas d'information supplémentaire, sans doute car, d'une part, les  $\log(P)$  entre le n-octanol et l'eau, du toluène (2,5) et de l'hexane (3,5) et, d'autre part, les fractions volumique et molaire, sont proches. Il peut être noté que la  $V_i(sp)$  optimale est obtenue pour un  $\log(P)_{\text{mélange}}$  proche de 3.



**Figure C.3.4.5.b :** Evolution de  $V_i(sp)$  en fonction du  $\log(P)_{\text{mélange}}$  calculé.  
Mêmes conditions que la Figure C.3.4.5.a.

#### C.3.4.6. Influence du rapport molaire BzOH/MeOH

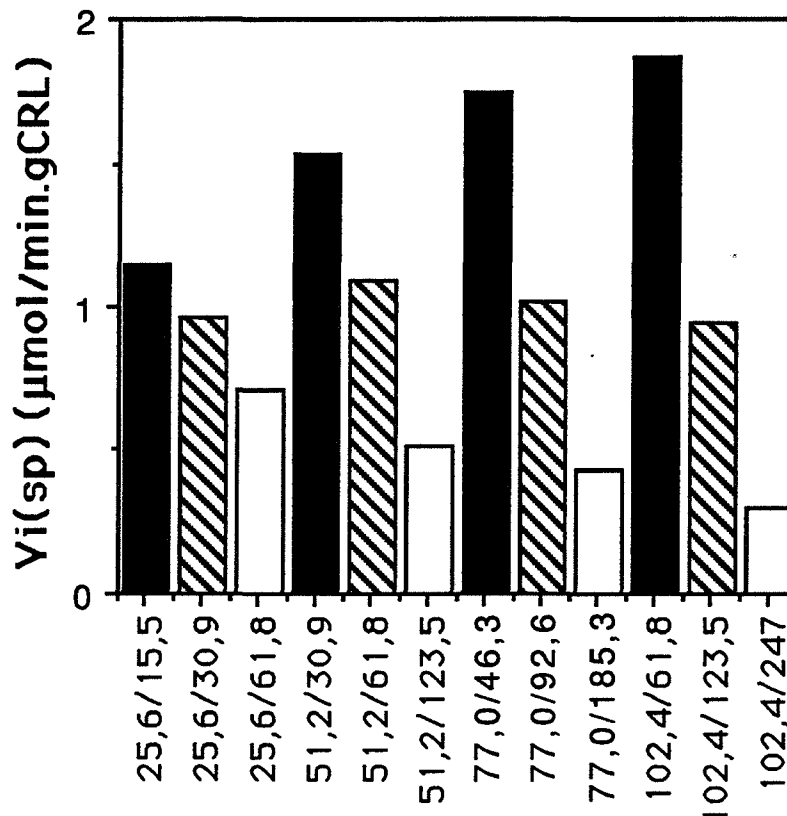
##### C.3.4.6.1. Influence du rapport molaire BzOH/MeOH sur la vitesse initiale spécifique

Vis-à-vis de la  $V_i(sp)$ , diminuer le rapport molaire BzOH/MeOH conduit à une diminution d'activité enzymatique, et ceci quelle que soit la concentration en BzOH comprise entre 25,6 et 102,4 mM (Figure C.3.4.6.1.a). Ce résultat n'est pas étonnant dans la mesure où ceci revient à augmenter la concentration en MeOH dans le système par rapport à la concentration en BzOH. Or, le MeOH est inhibiteur de la CRL (cf paragraphes C.3.3.4. et C.3.3.7.). Il faut noter, par ailleurs, que dans ces conditions, aucune courbe sigmoïdale - taux de conversion en fonction du temps- n'a été observée.

Dans la gamme de travail choisie, le rapport BzOH/MeOH semble intervenir de manière directe sur  $V_i(sp)$ . Ainsi, pour un rapport de 1,66 (colonnes noires), la  $V_i(sp)$  augmente quasi régulièrement avec l'augmentation des concentrations en BzOH et MeOH : le passage de 25,6/15,5 à 102,4/61,8 permet de multiplier la  $V_i(sp)$  par 1,6 (de 1,24 à 1,99  $\mu\text{mol/min.gCRL}$ ).

En revanche, pour un rapport de 0,83 (colonnes hachurées), la  $V_i(sp)$  reste quasiment inchangée, autour de 1  $\mu\text{mol/min.gCRL}$ . En ramenant le rapport à 0,41 (colonnes

blanches), la  $V_i(sp)$  diminue alors, lorsque les concentrations en BzOH et MeOH augmentent simultanément : la  $V_i(sp)$  chute de 1/3 en passant de 25,6/61,8 à 102,4/247 (de 0,6 à 0,4  $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ ).

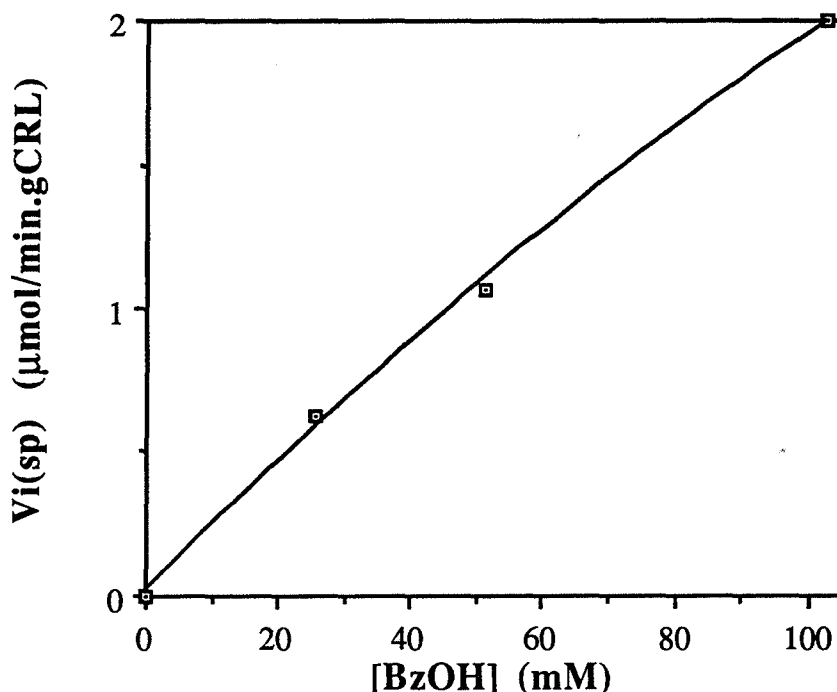


**Figure C.3.4.6.1.a :** Influence du rapport molaire BzOH/MeOH sur la vitesse initiale spécifique.

*Toluène/hexane saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l.*

La CRL est pré-équilibrée à  $a_w$  0,65. Les valeurs en abscisses correspondent aux rapports des concentrations molaires BzOH/MeOH (mM/mM).

Un excès d'acide benzoïque semble donc être une bonne façon d'activer la CRL en début de réaction. En particulier, ceci empêche la perte d'activité enzymatique associée à l'augmentation de la concentration en MeOH (BzOH/MeOH = 1,66). Ceci tendrait à prouver que la CRL est protégée par la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme. En effet, l'acide benzoïque est mis en contact avec la CRL, et le tout est incubé pendant 10 min (220 tr/min, 37°C) avant l'introduction du MeOH. Cette incubation en présence de BzOH favorise ainsi la formation de cet intermédiaire. Par exemple, pour une même concentration en MeOH (61,8 mM), le passage d'un rapport de 0,41 à 1,66 multiplie la  $V_i(sp)$  par 3,2 (Figure C.3.4.6.1.b).



**Figure C.3.4.6.1.b** : Evolution de la vitesse initiale spécifique en fonction de la concentration en acide benzoïque pour 61,8 mM de méthanol.

*Conditions identiques à la Figure C.3.4.6.1.a.*

#### C.3.4.6.2. Influence du rapport molaire BzOH/MeOH sur les taux de conversion et la quantité de BzOMe produite

Etant donné que les concentrations en substrats varient, il est nécessaire de suivre à la fois le taux de conversion et la quantité de BzOMe formée, car les taux de conversion ne reflètent pas l'efficacité catalytique de la CRL, à moins de calculer les taux de conversion par rapport au substrat en défaut. Chaque rapport va être détaillé séparément.

##### C.3.4.6.2.1 Rapport molaire BzOH/MeOH de 0,83

Pour un rapport molaire de 0,83, il n'est pas étonnant de constater que moins il y a de substrat, plus l'équilibre thermodynamique est atteint rapidement (Figure C.3.4.6.2.1.a).

Par contre, la quantité d'ester produite est la même pour les concentrations en substrats choisies du moins jusqu'à 1,4 j de réaction (Figure C.3.4.6.2.1.b). Ceci peut être mis en relation avec l'étude de la vitesse initiale spécifique (voir Figure C.3.4.6.1.a). Après 2,8 j, avec un rapport 25,6/30,9, un taux de conversion maximal est atteint et 88,4% de BzOH, soit 0,45 mmol, a été transformé. Après 2,8 j, pour des concentrations en BzOH plus élevées, la quantité de BzOMe biosynthétisée est environ la même, autour de 0,79 mmol. Après des temps plus longs, la quantité de BzOMe augmente encore pour des concentrations les plus élevées.

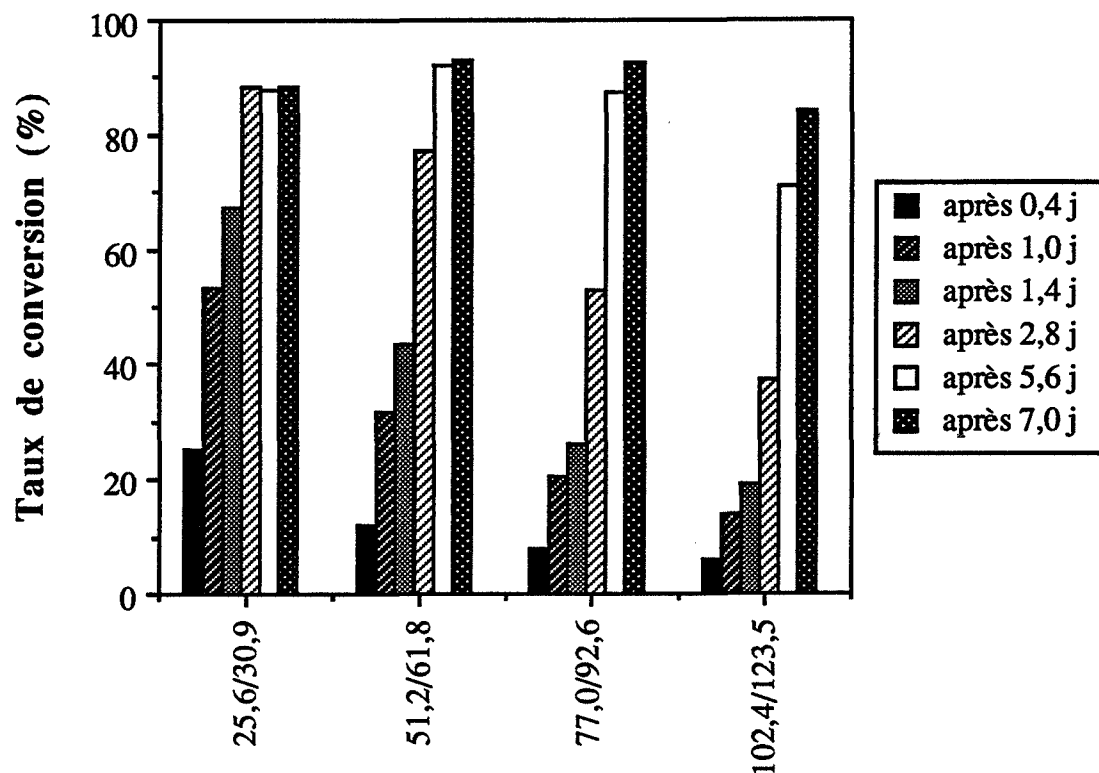


Figure C.3.4.6.2.1.a : Evolution du taux de conversion pour un BzOH/MeOH de 0,83. Conditions identiques à la Figure C.3.4.6.1.a.

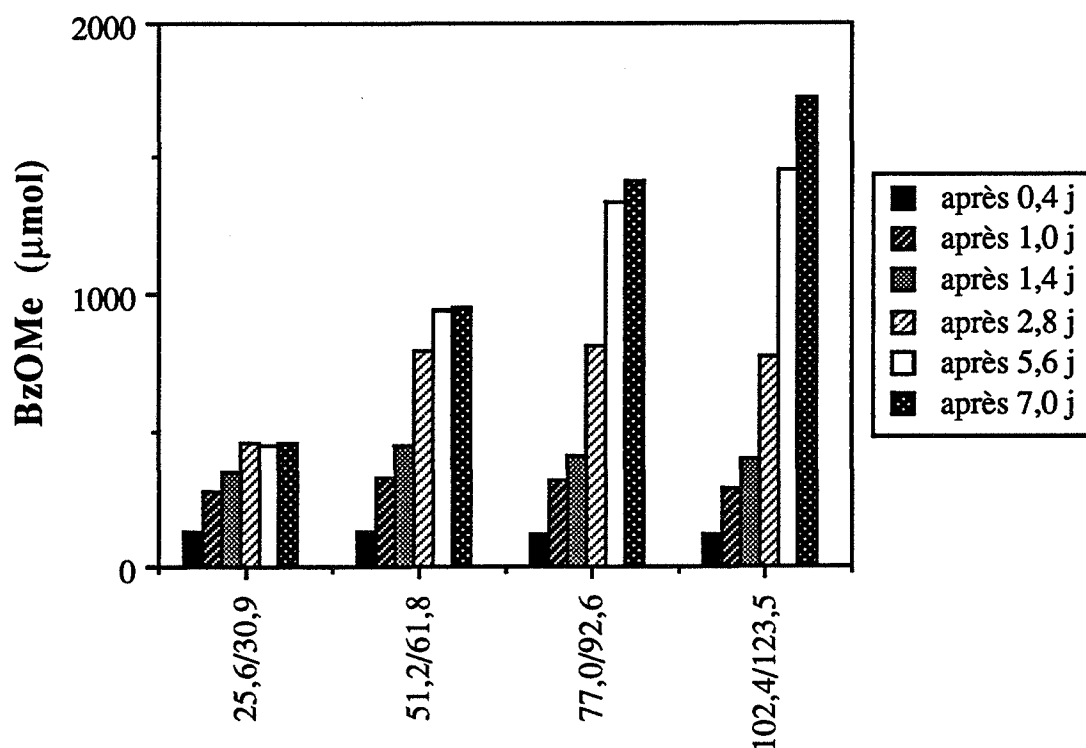


Figure C.3.4.6.2.1.b : Evolution de la quantité de BzOMe pour un rapport de 0,83. Conditions identiques à la Figure C.3.4.6.1.a.

## C.3.4.6.2.2. Rapport molaire BzOH/MeOH de 1,66

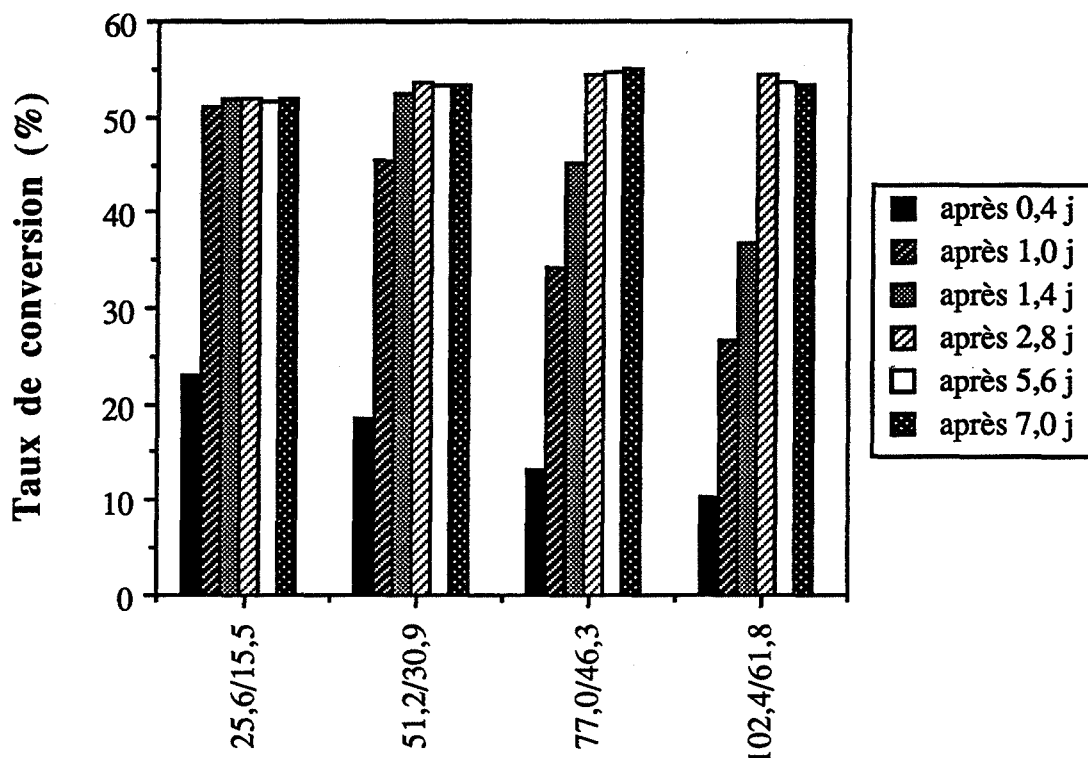
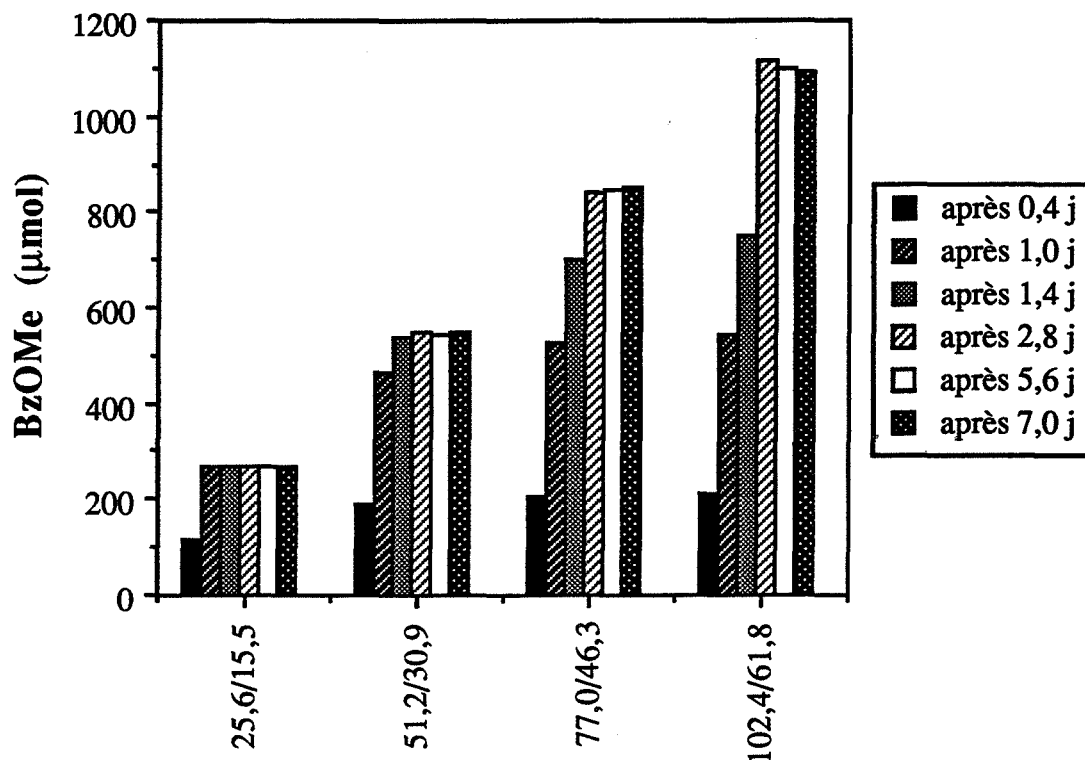


Figure C.3.4.6.2.2.a : Evolution du taux de conversion pour un BzOH/MeOH de 1,66. Conditions identiques à la Figure C.3.4.6.1.a

Pour des rapports BzOH/ MeOH de 1,66, le suivi des taux de conversion indique que l'équilibre thermodynamique est atteint plus rapidement pour des faibles concentrations en BzOH (Figure C.3.4.6.2.2.a), car il y a moins de BzOH à estérifier. Ainsi, la réaction est presque terminée après seulement 1 j pour 25,6 mM de BzOH, 1,4 j pour 51,2 mM, 2 j pour 77,0 mM et 2,8 j pour 102,4 mM : le taux de conversion final atteint alors 53% par rapport au BzOH introduit.

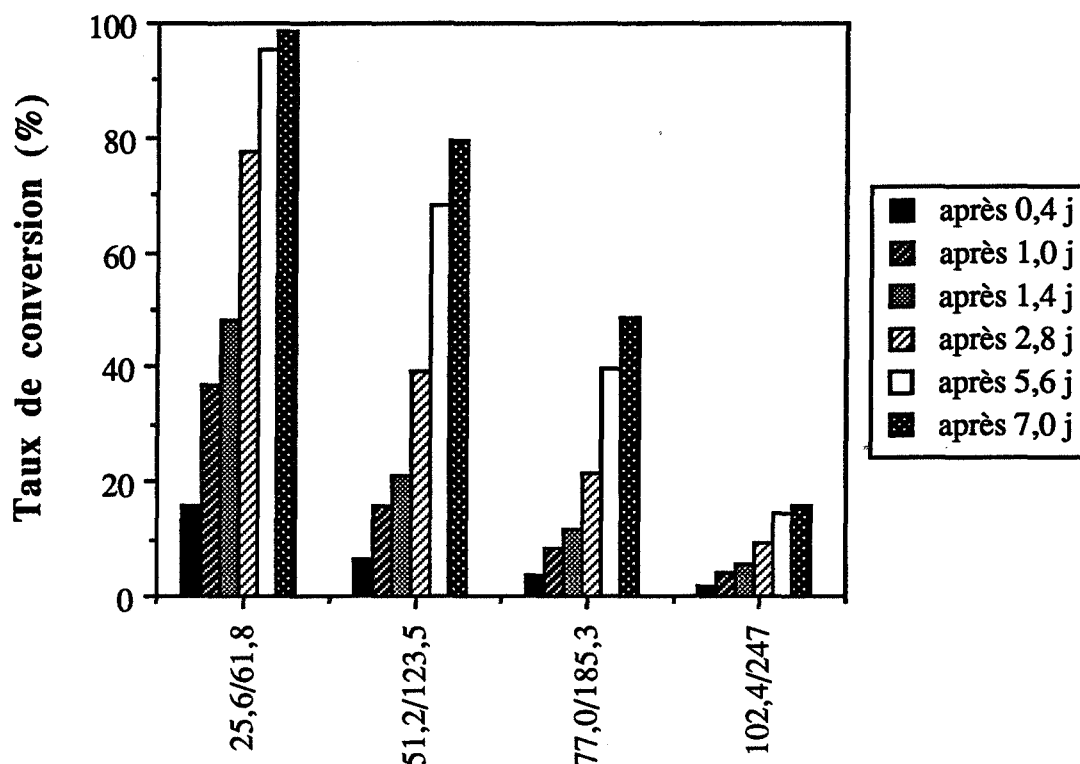
En examinant la quantité de BzOMe produite (Figure C.3.4.6.2.2.b), il se dégage que, plus les concentrations en BzOH et MeOH augmentent simultanément, plus la CRL est efficace et produit plus de BzOMe. Il semblerait que d'avoir de l'acide benzoïque en excès par rapport au MeOH, favorise la synthèse de BzOMe. Ceci a déjà été signalé dans le suivi de la Vi(sp). Il faut cependant ne pas oublier que seulement 53% du BzOH introduit a réagi en fin de réaction, car le MeOH est en défaut. D'un point de vue cinétique, ce résultat est donc intéressant, mais le taux de conversion final de BzOH le plus élevé possible est l'un des critères choisis car le BzOH obtenu "naturellement" est le substrat le plus cher.



**Figure C.3.4.6.2.2.b :** Evolution de la quantité de BzOMe pour un rapport de 1,66. Conditions identiques à la Figure C.3.4.6.1.a.

#### C.3.4.6.2.3. Rapport molaire BzOH/MeOH de 0,41

Par contre, pour des rapports de 0,41, la réaction est beaucoup plus lente et seul l'essai avec le rapport 25,6/61,8 a atteint l'équilibre thermodynamique après 7 j de réaction (Figure C.3.4.6.2.3.a). Le taux de conversion final est alors de 98,4%. Ce dernier est le plus important obtenu. Il faut donc un excès plus important en MeOH pour déplacer encore plus l'équilibre de la réaction dans le sens estérification. En contre-partie, l'estérification est beaucoup plus lente. L'observation de la quantité d'ester produite amène les mêmes remarques sauf que la quantité produite pour le rapport 51,2/123,5 dépasse celle produite dans le cas 25,6/61,8 à partir de 2,8 j (Figure non montrée).



**Figure C.3.4.6.2.3.a** : Evolution du taux de conversion pour un rapport molaire BzOH/MeOH de 0,41.

Conditions identiques à la Figure C.3.4.6.1.a.

### C.3.4.6.3. Conclusion

Le rapport molaire BzOH/MeOH influe grandement sur la cinétique de réaction. Le rapport de 1,66 est le plus favorable pour la vitesse initiale, mais la réaction ne peut pas thermodynamiquement dépasser un taux de conversion final de 53%. Cette amélioration de  $V_i(sp)$  est sans doute la conséquence de la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme, à la fois étape limitant la réaction mais aussi protégeant la CRL de l'inhibition par le MeOH. En abaissant ce rapport molaire, la réaction devient plus lente, et les réactions atteignent leurs positions d'équilibre uniquement pour les essais contenant de faibles concentrations en substrats.

Il faut donc avoir un rapport molaire BzOH/MeOH suffisamment élevé pour avoir une vitesse initiale importante, mais modéré pour pouvoir atteindre des taux de conversion supérieurs à 90%.



## C.4. CONCLUSION DU CHAPITRE C

La synthèse du benzoate de méthyle est possible avec des taux de conversion supérieurs à 95%, par le système mis en place pendant l'étude préliminaire. Ce système consiste à mettre en suspension la lipase de *Candida rugosa* dans un mélange de toluène et hexane, milieu organique contenant l'acide benzoïque et le méthanol.

De nombreux facteurs ont été étudiés afin de comprendre la catalyse enzymatique en milieu hétérogène microaqueux et optimiser la réaction. L'estérification enzymatique est fortement dépendante de la teneur en eau dans le réacteur. En particulier, un minimum d'eau est nécessaire pour ne pas observer de cinétiques autocatalytiques. Ce minimum d'eau est fonction de la concentration en méthanol, de la teneur en CRL et de la fraction en toluène dans le milieu organique. La répartition de l'eau dans le réacteur, et surtout au niveau de la phase catalytique, est fortement dépendante de ces trois facteurs. De même, il a été remarqué que l'eau produite pendant la réaction se retrouve principalement autour de la CRL, ce qui, pour des concentrations importantes en eau, aboutit à un ralentissement de la vitesse de réaction et un possible déplacement de l'équilibre moins favorable à la formation de BzOMe. Ce dernier est lié à la formation d'agrégats visibles. Ceci se traduit par la baisse de la vitesse d'estérification au cours de la réaction, du fait d'un accès réduit des substrats vers les sites actifs.

Le substrat méthanol, à partir de faibles concentrations, est un inhibiteur de la CRL. Son action sur le catalyseur est dépendante de sa concentration et de la quantité d'eau adsorbée par la CRL. En particulier, à forte concentration, il n'agit que sur l'activité de la CRL, indépendamment de la quantité d'eau adsorbée. A faible concentration, il intervient à la fois directement sur la CRL et sur son degré d'hydratation. Cette interaction méthanol-eau rend la modélisation de la vitesse initiale difficile. L'inhibition par le méthanol est en partie levée en augmentant la concentration en acide benzoïque : ceci est sans doute la conséquence d'une répartition différente du méthanol dans le réacteur et de la formation d'un complexe acyl-enzyme protégeant la CRL.

Le toluène est nécessaire pour solubiliser l'acide benzoïque. Cependant, il agit sur la répartition des substrats, en particulier de l'acide benzoïque. Ainsi, pour une fraction volumique de toluène supérieure à 35%, son effet est négatif sur la cinétique de réaction. De même, s'il n'est pas saturé en eau, il agit négativement sur le degré d'hydratation de la CRL en désorbant une partie de l'eau présente dans la phase enzymatique. Il est nécessaire d'optimiser la fraction de toluène dans le milieu organique. Malheureusement, cet optimum est dépendant des conditions de réaction.

Travailler à activité en eau fixée permettrait de limiter certaines interactions. Par la technique de pré-équilibre utilisée, il n'est pas possible d'équilibrer le méthanol, trop hydrophile, totalement miscible à l'eau, et volatil. L'emploi d'un alcool moins hydrophile, non ou partiellement miscible à l'eau et moins volatil, permettrait de contourner certains problèmes et de mieux interpréter certains résultats. Ceci sera développé dans le chapitre D.



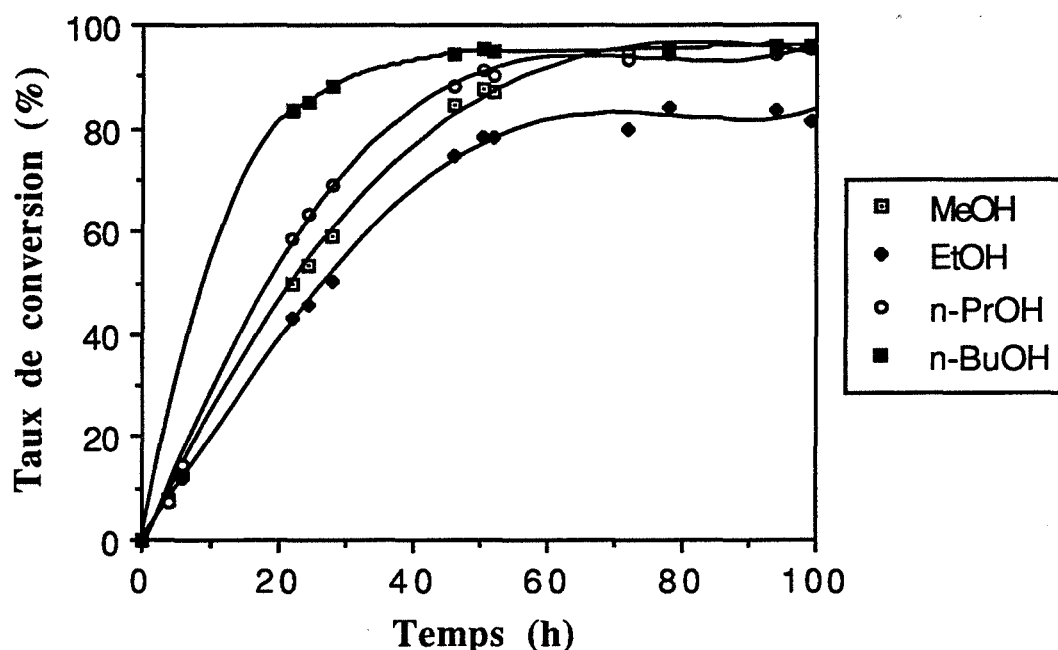
**CHAPITRE D**  
**LES BENZOATES DE BUTYLE**



## INTRODUCTION DU CHAPITRE D

Le but du chapitre D est de montrer que le système enzymatique employé pour obtenir le benzoate de méthyle peut être appliqué à la synthèse d'autres benzoates. Ceci permettra de confirmer et de généraliser certaines conclusions obtenues avec le benzoate de méthyle.

Le système utilisé pour obtenir le benzoate de méthyle peut être employé pour synthétiser d'autres benzoates (Figure D.a). La nature de l'alcool influe grandement sur la cinétique de réaction. Dans le chapitre D, nous étudierons, plus particulièrement, la synthèse de benzoates de butyle.

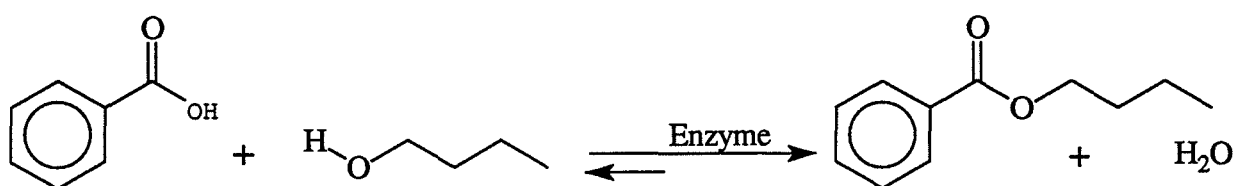


**Figure D.a :** Influence de la nature de l'alcool sur l'évolution des taux de conversion surfaciques.

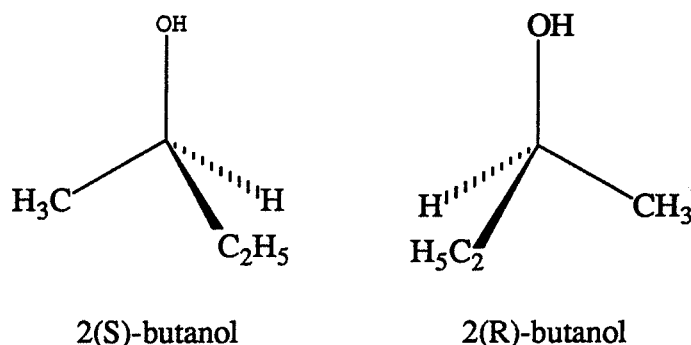
[BzOH] 51,8 mM, [Alcool] 62 mM, toluène/hexane saturés en eau 50/50, CRL 10 g/l, eau ajoutée 500 mg/l.

Remarque : en l'absence de standards pour les benzoates d'éthyle et de n-propyle, seuls les taux de conversion calculés à partir des surfaces obtenues en CPG sont présentés.

Dans un premier temps, nous étudierons la synthèse enzymatique du benzoate de 1-butyle. L'équation de la réaction est la suivante :



Dans un deuxième temps, nous aborderons un nouvel aspect qui est la stéréosélectivité du système en travaillant avec le 2-butanol, le plus petit alcool chiral possible. De même, nous pourrions comparer les résultats entre le 1- et le 2-butanol, isomères géométriques. Les formules chimiques semi-développées des énantiomères du 2-butanol sont représentées ci-après :



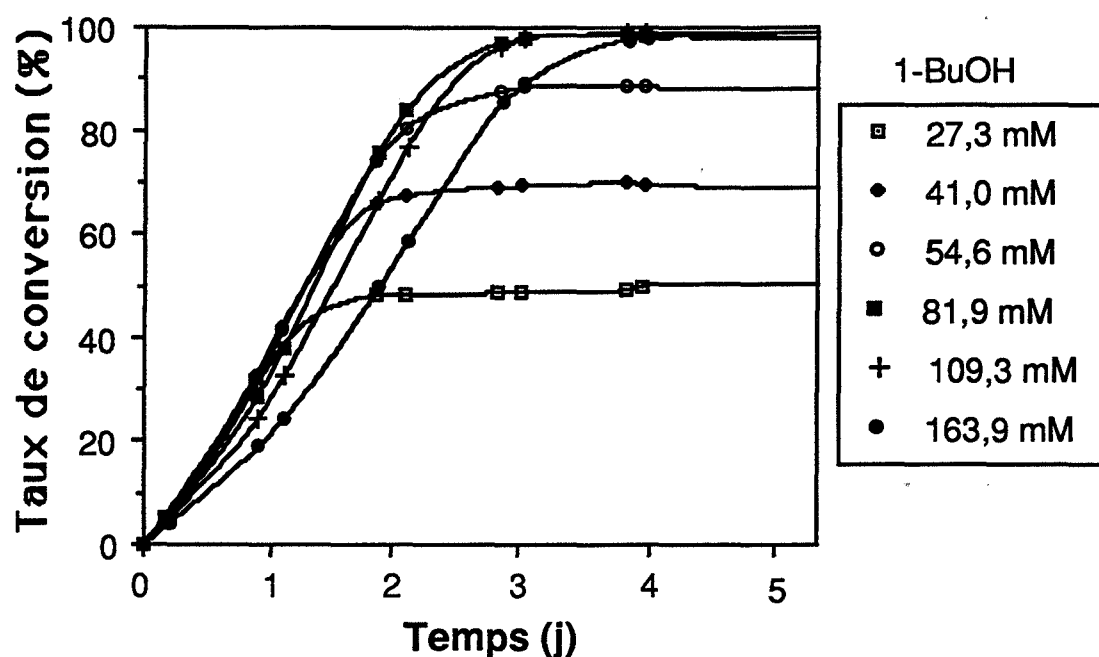
## D.1. LE BENZOATE DE 1-BUTYLE

### D.1.1. Effet de la concentration en 1-butanol sur la lipase non pré-équilibrée

#### D.1.1.1. Sans addition d'eau

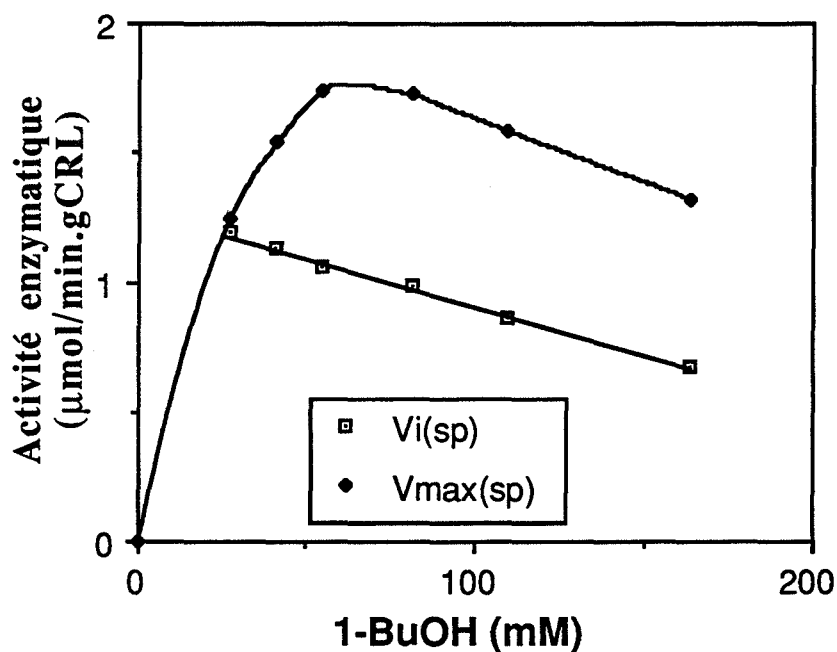
Comme avec le MeOH, les courbes des taux de conversion de BzOH en fonction du temps ont une allure autocatalytique (Figure D.1.1.1.a). Ce phénomène est toutefois beaucoup moins important avec le 1-butanol (1-BuOH) et a tendance à s'accroître avec l'augmentation de la concentration en alcool. Ceci corrobore bien les résultats obtenus avec le MeOH : la CRL n'est pas suffisamment hydratée pour être totalement active sans addition supplémentaire d'eau, et l'alcool tend à désorber l'eau déjà présente au niveau de la poudre catalytique. Ainsi, la réaction est terminée après 1,6, 2,8 et 4,2 j pour respectivement 27,3, 81,9 et 163,9 mM de 1-BuOH. Par rapport au MeOH, la réaction est donc plus rapide, puisque, pour 62 mM de MeOH sans ajout d'eau, l'équilibre thermodynamique de la réaction n'est atteint qu'après 4 j au minimum (cf Figure C.3.3.1.a ou C.3.3.1.c).

L'obtention de sigmoïdes nous oblige à étudier simultanément la vitesse initiale spécifique ( $V_i(sp)$ ) et la vitesse maximale spécifique ( $V_{max}(sp)$ ) (Figure D.1.1.1.b). En diminuant la concentration en 1-BuOH, ces deux valeurs sont de plus en plus proches, car l'effet autocatalytique tend à disparaître. Ceci est surtout vrai pour 27,3 mM de 1-BuOH. Cependant, le comportement de ces deux grandeurs est très différent avec l'augmentation de la concentration en alcool.



**Figure D.1.1.1.a :** Evolution des taux de conversion de BzOH en fonction de la concentration en 1-butanol.

*[BzOH] 50 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane saturés en eau 50/50.*



**Figure D.1.1.1.b :** Evolution des vitesses spécifiques initiale et maximale de réaction en fonction de la concentration en 1-butanol.

*Conditions identiques à la Figure D.1.1.1.a.*

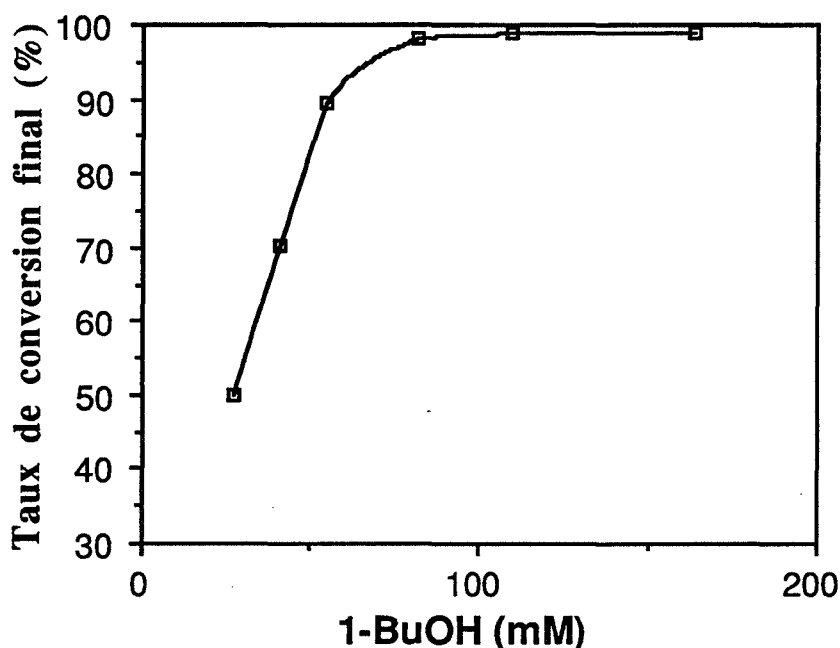
En effet, la  $V_i(sp)$  décroît linéairement entre 27,3 et 163,9 mM de 1-BuOH. Cette chute de la  $V_i(sp)$  est à mettre en relation avec la répartition de la quantité d'eau totale dans le système, et plus particulièrement, avec l'eau adsorbée au niveau de la lipase. L'augmentation



de la concentration en 1-BuOH dans le système, même s'il est moins hydrophile que le MeOH, aboutit à une désorption partielle d'eau de la poudre enzymatique.

Cependant, il faut noter que les  $V_i(sp)$  obtenues sont environ trois fois supérieures à celles obtenues avec le MeOH dans des conditions similaires. Ainsi, la CRL est plus active pour le substrat 1-BuOH.

D'autre part, la courbe des  $V_{max}(sp)$  présente un optimum autour de 60 mM de 1-BuOH. Au-delà, le 1-BuOH est en excès au niveau des sites catalytiques et inhibe la réaction.



**Figure D.1.1.1.c :** Influence de la concentration en 1-butanol sur le taux de conversion final.

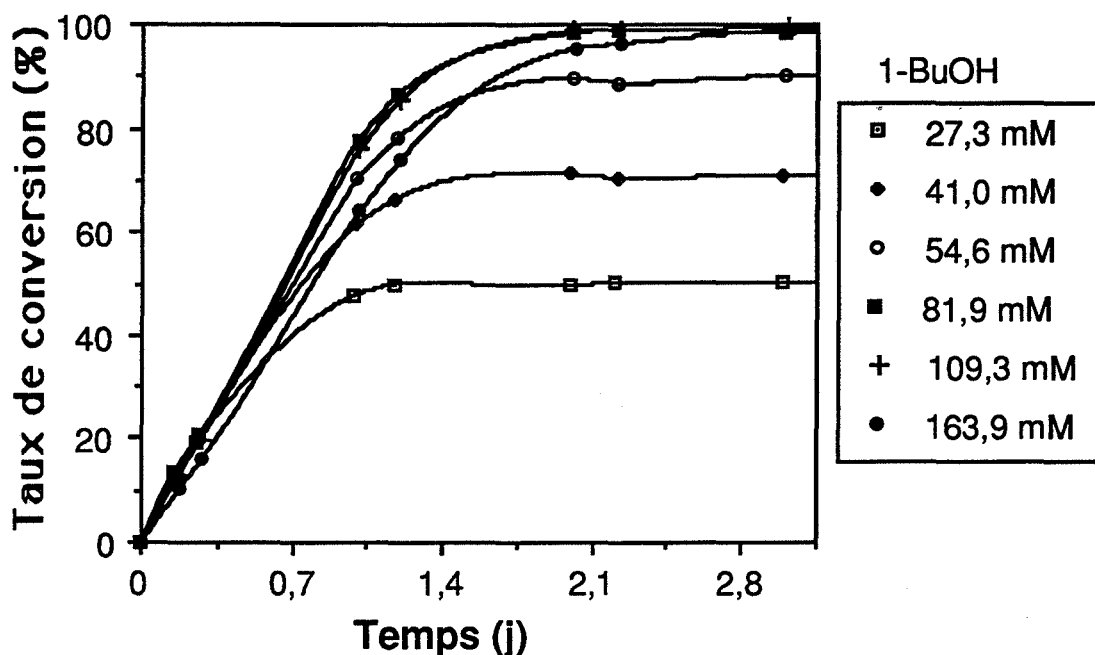
*Conditions identiques à la Figure D.1.1.1.a.*

Le taux de conversion final de l'acide benzoïque a été déterminé après 5,6 j de réaction : l'équilibre final est alors atteint quelle que soit la concentration en 1-BuOH (Figure D.1.1.1.c). Il faut un large excès de 1-BuOH, soit 81,9 mM, pour obtenir des taux finaux supérieurs à 98%. Cette valeur correspond à un excès en 1-BuOH de 60%. Il faut signaler que pour le MeOH, un excès de 23% seulement en MeOH est nécessaire pour obtenir de tels taux dans les mêmes conditions de réaction.

#### D.1.1.2. Avec une addition d'eau de 500 mg/l

Une addition d'eau faible (500 mg/l) suffit à éliminer l'aspect autocatalytique des courbes (Figure D.1.1.2.a). Ce résultat confirme qu'il manque de l'eau dans le système en

début de réaction. En examinant plus précisément, la courbe est sigmoïdale pour une concentration en 1-BuOH de 163,9 mM. Par conséquent, la quantité d'eau, nécessaire au début de la réaction, est dépendante de la concentration en alcool dans le système, c'est-à-dire que l'augmentation de la quantité de 1-BuOH dans le système implique une répartition de l'eau différente et en défaveur de la phase enzymatique. En effet, le 1-BuOH, bien que moins hydrophile par rapport au MeOH, est partiellement miscible à l'eau. La solubilité de l'eau dans le 1-BuOH à 20°C est de 19,7% (g/g).



**Figure D.1.1.2.a** : Evolution du taux de conversion en fonction de la concentration en 1-butanol.

[BzOH] 50 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane saturés en eau 50/50, eau ajoutée 500 mg/l.

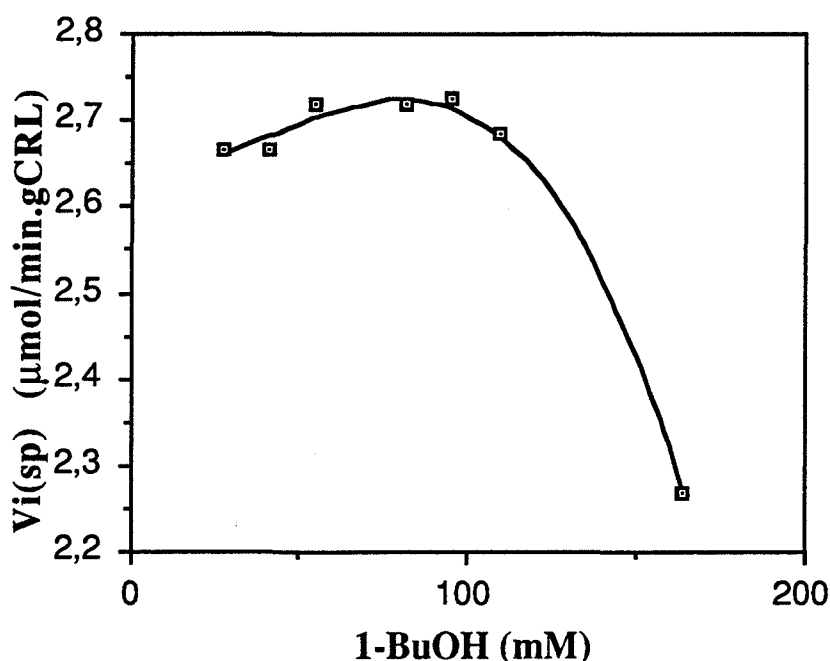
L'ajout d'eau (500 mg/l) permet de diminuer le temps de réaction : tous les essais ont atteint leur équilibre final après 2,8 j de réaction (valeur pour une concentration en 1-BuOH de 163,9 mM) (Figure D.1.1.2.a). Par exemple, en ajoutant 500 mg d'eau/l, le temps de réaction passe de 1,6 à 1,2 j pour 27,3 mM de 1-BuOH.

Si la limite choisie est ramenée à un taux de conversion de 90%, le temps de réaction maximal, pour une concentration en 1-BuOH supérieure à 81,9 mM, n'est alors que de 1,9 j. En effet, en approchant de l'équilibre thermodynamique et à fortes concentrations en 1-BuOH, la vitesse de transformation diminue, soit parce que l'hydrolyse n'est plus négligeable devant l'estérification, soit parce que la diffusion des substrats vers les sites catalytiques, à l'intérieur des agrégats de CRL formés, devient l'étape limitante (essai avec 163,9 mM de 1-BuOH).

Avec un ajout d'eau de 500 mg/l, l'évolution de la  $V_i(sp)$  est grandement modifiée (Figure D.1.1.2.b). En particulier, les valeurs de  $V_i(sp)$  sont beaucoup plus importantes,

même vis-à-vis des  $V_{\max}(\text{sp})$  obtenues sans ajout d'eau (cf Figure D.1.1.1.b). Par ailleurs, la faible croissance de la courbe des  $V_i(\text{sp})$  avant l'optimum indique que le facteur eau est sans doute le plus limitant, et qu'il impose la cinétique de réaction. Ainsi, la concentration en 1-BuOH affecte peu la cinétique pour des concentrations inférieures à 92,9 mM. Ensuite, au-delà de l'optimum, la chute de  $V_i(\text{sp})$  est rapide. Ceci est la conséquence, d'une part, de l'apparition de l'inhibition par excès de 1-BuOH et, d'autre part, d'une hydratation insuffisante de la CRL. En effet, avec 500 mg d'eau/l, la courbe devient sigmoïdale pour 163,9 mM de 1-BuOH.

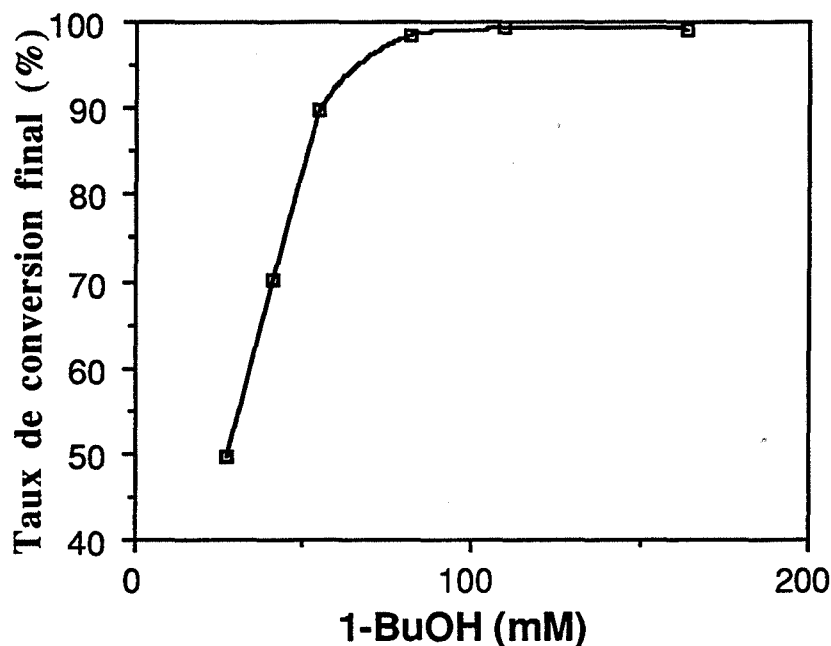
Il est, par conséquent, important de différencier ces deux phénomènes, en introduisant une quantité d'eau proportionnelle à la concentration en 1-BuOH. Ainsi, seule l'influence du 1-BuOH sur la réaction sera observée.



**Figure D.1.1.2.b** : Evolution de la vitesse initiale spécifique en fonction de la concentration en 1-butanol.

*Conditions identiques à la Figure D.1.1.2.a.*

L'ajout d'eau (500 mg/l) ne modifie pas la valeur des taux de conversion finaux (Figure D.1.1.2.c). Ceci revient à dire que l'eau ajoutée n'intervient pas dans la position de l'équilibre de réaction. Pour obtenir des taux de conversion supérieurs à 98%, la concentration minimale en 1-BuOH est de 81,9 mM.



**Figure D.1.1.2.c** : Influence de la concentration en 1-BuOH sur le taux de conversion final.

*Conditions identiques à la Figure D.1.1.2.a.*

### D.1.2. Effet de la concentration en 1-butanol sur la lipase pré-équilibrée à $a_w$ 0,65

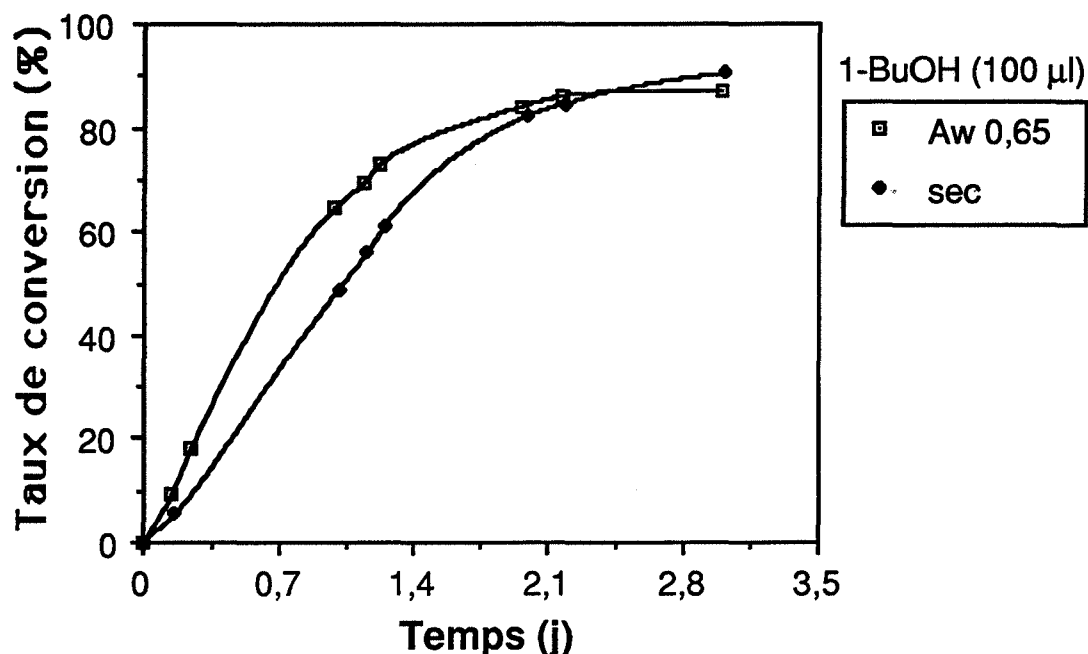
Nous avons vu, dans le paragraphe précédent D.1.1.2., qu'un ajout constant d'eau est favorable à la cinétique sans modifier la position de l'équilibre final. Or, un des points essentiels est que cette quantité d'eau optimale est dépendante de la solubilité de l'eau dans le milieu organique, et donc de la quantité de 1-BuOH présente dans ce milieu. Introduire une quantité d'eau proportionnelle à la quantité de 1-BuOH permettrait d'éliminer les artefacts observés sur la Vi(sp) avec un ajout constant d'eau. Ceux-ci sont liés à l'interaction forte entre l'alcool et l'eau adsorbée à la CRL.

#### D.1.2.1. Influence de l'hydratation du 1-butanol

Dans un premier temps, il est intéressant de comparer les courbes -taux de conversion en fonction du temps- lorsque le 1-BuOH est sec ou pré-équilibré à  $a_w$  0,65 (Figure D.1.2.1.a).

Avec du 1-BuOH sec, la réaction a une allure autocatalytique et n'atteint pas son équilibre final après 2,8 j de réaction. En particulier, la vitesse de réaction, après avoir atteint un maximum, diminue après 1,7 j de réaction. Ainsi, la fin de la réaction est très lente, alors que ce n'est pas le cas avec le MeOH sec et des solvants saturés en eau sans ajout d'eau (voir Figure C.3.3.1.a).

Lorsque le 1-BuOH est pré-équilibré à la même activité que la CRL, le temps de latence disparaît, c'est-à-dire que les vitesses initiale et maximale sont confondues. Ainsi, la réaction est plus rapide au départ, et elle atteint son équilibre final plus rapidement après seulement 2,1 j avec un taux de conversion final de 85,3%.



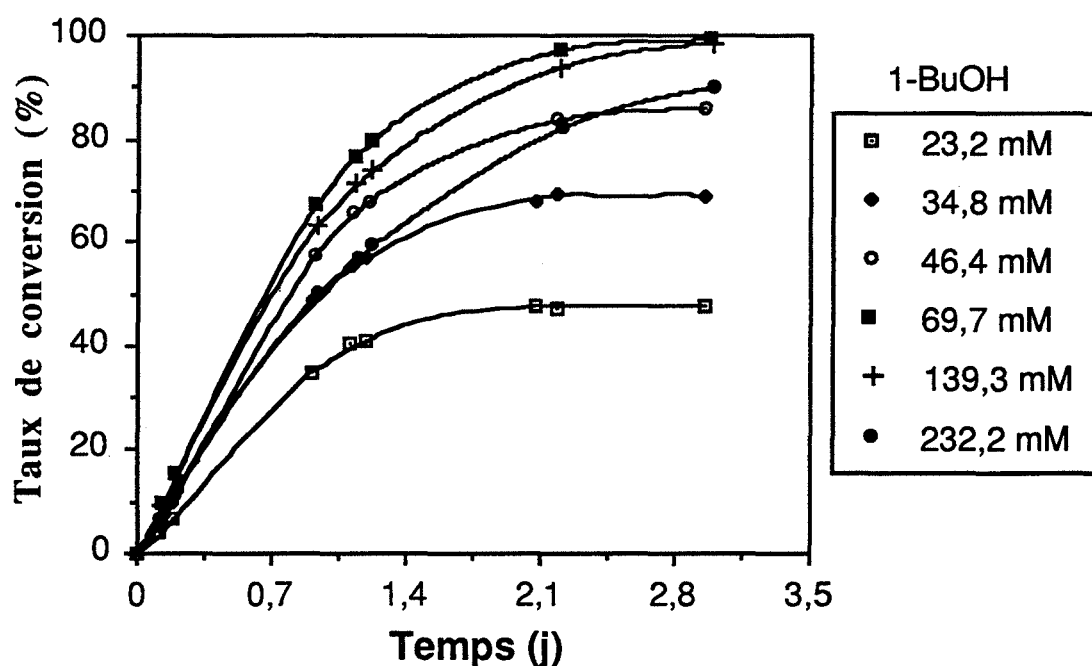
**Figure D.1.2.1.a** : Influence du pré-équilibrage du 1-butanol sur la cinétique de réaction. *[BzOH] 51,2 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane saturés en eau 50/50.*

La CRL est pré-équilibrée à  $a_w$  0,65 (eau adsorbée 0,046 g/gCRL). Le 1-BuOH est pré-équilibré à  $a_w$  0,65 par contact avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaNO}_2$ .

Après 2,4 j, le taux de conversion obtenu avec le 1-BuOH sec devient supérieur à celui obtenu avec le 1-BuOH pré-équilibré. En effet, seul le volume de 1-BuOH avait été fixé à 100  $\mu\text{l}$ . 100  $\mu\text{l}$  de 1-BuOH sec correspondent à une concentration de 54,6 mM, soit seulement un excès d'alcool de 6,6%. Or, pré-équilibrer le 1-BuOH à  $a_w$  0,65 revient à introduire 15% d'eau dans le 1-BuOH. Pour le 1-BuOH pré-équilibré, 100  $\mu\text{l}$  représentent donc 46,4 mM, soit un défaut d'alcool (90,6% du BzOH présent). Dans les deux cas, ces deux concentrations ne sont pas suffisantes pour obtenir des taux de conversion supérieurs à 98%, car nous avons vu qu'il faut un excès en 1-BuOH plus important, de 60%, pour atteindre cet objectif (cf paragraphe D.1.1.1.). Il est donc normal aussi de constater des taux de conversion supérieurs avec l'alcool sec. Pour une meilleure comparaison, il aurait fallu travailler avec la même concentration en 1-BuOH dans les deux cas. Ceci, malheureusement, n'a pas été réalisé.

### D.1.2.2. Système 1-BuOH pré-équilibré à $a_w$ 0,65 et solvants saturés en eau

Il est intéressant de voir l'influence du 1-BuOH pré-équilibré à  $a_w$  0,65 dans un système où le milieu organique est saturé en eau. Les cinétiques obtenues dans ce cas ne sont pas autocatalytiques car le 1-BuOH est pré-équilibré à  $a_w$  0,65 (Figure D.1.2.2.a). De même, en fin de réaction, la vitesse d'estérification est beaucoup plus lente, et le temps de réaction pour atteindre l'équilibre de la réaction est dépendant de la concentration en 1-BuOH. Ainsi, pour 232,2 mM de 1-BuOH, la réaction n'est pas terminée après 2,8 j (dernière analyse réalisée). Comme avec le MeOH, l'étape limitante, en fin de réaction, devient alors la diffusion des substrats vers les sites actifs de la CRL. Ceci veut également dire que l'eau, quelle soit introduite par le 1-BuOH qui a déjà réagi, ou formée lors de la réaction, se retrouve principalement adsorbée sur la CRL et forme, outre une pellicule d'eau autour des grains de poudre, des agrégats limitant l'accès des substrats aux sites catalytiques. En effet, la morphologie de la CRL, en fin de réaction, est similaire à celle obtenue lors du pré-équilibrage à des activités en eau élevées.



**Figure D.1.2.2.a** : Evolution des taux de conversion en fonction de la concentration en 1-butanol.

[BzOH] 50 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane saturés en eau 50/50.

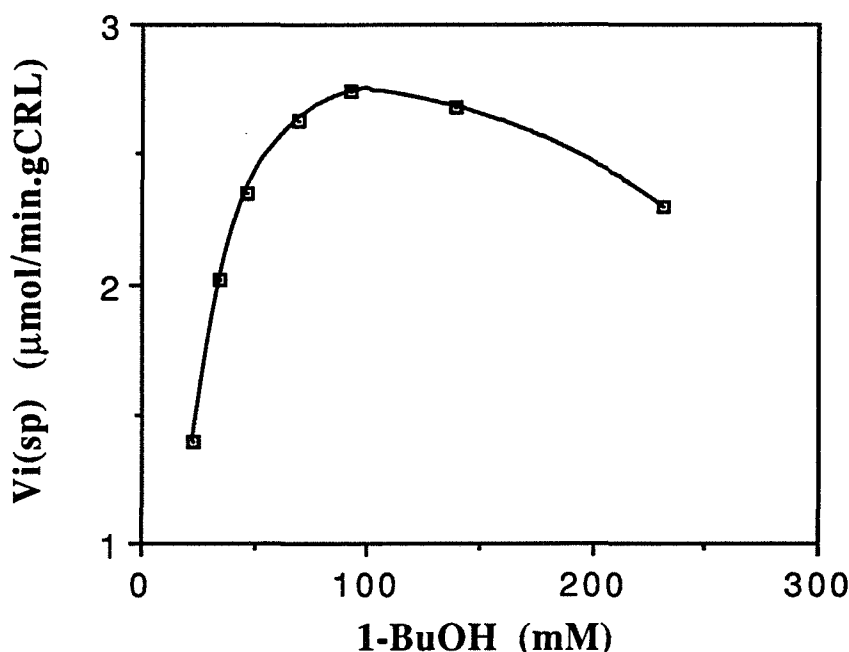
La CRL et le 1-BuOH sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65 (eau adsorbée par la CRL 0,046 g/gCRL).

Avec une introduction d'eau proportionnelle au volume d'alcool, et donc à la concentration en 1-BuOH, la  $V_i(sp)$  optimale est obtenue pour la même concentration en 1-BuOH (Figure D.1.1.2.b), soit 92,9 mM dans les conditions de réaction choisies (Figure D.1.2.2.b). Toutefois, contrairement à un ajout constant de 500 mg/l (cf paragraphe

D.1.1.2. et la Figure D.1.1.2.b), la courbe a une allure habituelle, en particulier pour les faibles concentrations en 1-BuOH. Ceci confirme que le 1-BuOH interagit avec l'eau présente, et que, pour éliminer cet effet, il faut introduire l'eau proportionnellement à la quantité de 1-BuOH.

Par contre, les valeurs optimales des  $V_i(sp)$ , que ce soit avec un ajout d'eau constant de 500 mg/l ou proportionnel, sont très voisines, et ce malgré la présence d'une quantité d'eau différente dans le système. Ceci laisserait à penser que la  $V_i(sp)$  n'est plus dépendante de la teneur en eau dans le système. Malheureusement, aucune étude de l'influence de la teneur en eau sur la  $V_i(sp)$  n'a été réalisée avec le 1-BuOH. Cependant, les résultats obtenus avec le MeOH nous permettent de penser que cette hypothèse est vraie et que nous sommes déjà dans le domaine où la  $V_i(sp)$  est indépendante de la quantité d'eau ajoutée (cf Figure C.3.3.1.d). En effet, le 1-BuOH étant beaucoup moins hydrophile, la  $V_i(sp)$  optimale doit être atteinte pour des teneurs en eau plus faibles.

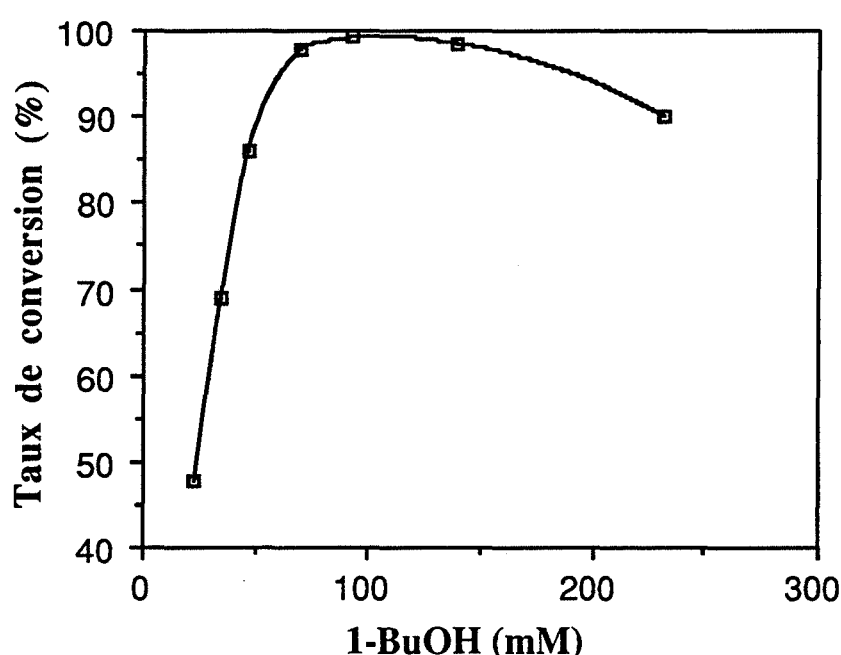
Enfin, la chute après l'optimum n'est pas aussi brutale car, avec un ajout d'eau proportionnel, il n'y a pas de phénomène autocatalytique s'additionnant à l'inhibition par excès de 1-BuOH. Ceci n'est pas le cas avec un ajout d'eau de 500 mg/l (cf paragraphe D.1.1.2).



**Figure D.1.2.2.b** : Evolution de la vitesse initiale spécifique en fonction de la concentration en 1-butanol.

*Conditions identiques à la Figure D.1.2.2.a.*

Pour des concentrations en 1-BuOH inférieures à 92,9 mM, l'allure de la courbe de la Figure D.1.2.2.c est proche de celles obtenues avec un ajout d'eau de 500 mg/l et sans ajout d'eau (cf Figures D.1.1.2.c et D.1.1.1.c). A partir de 92,9 mM, en effet, les estérifications ne sont pas encore terminées après 3 j de réaction (cf Figure D.1.2.2.a), ce qui explique la chute des taux de conversion de BzOH observée à partir de 92,9 mM. La fin de la réaction n'a pas pu être suivie, mais d'autres résultats ont montré que le taux de conversion continue à évoluer jusqu'à 99,5%. Il semble donc, que la position de l'équilibre de la réaction n'est pas modifiée en présence de différentes quantités d'eau. Par contre, la quantité d'eau dans le système joue sur la cinétique car, au début de la réaction, la CRL doit être activée et, en fin de réaction, les limitations diffusionnelles des substrats doivent être minimales.



**Figure D.1.2.2.c** : Evolution du taux de conversion de BzOH après 3 j de réaction en fonction de la concentration en 1-butanol.

*Conditions identiques à la Figure D.1.2.2.a.*

### D.1.2.3. Système 1-butanol et solvants pré-équilibrés à $a_w$ 0,65

Dans le paragraphe précédent, le toluène et l'hexane étaient saturés en eau. Or, il serait intéressant de travailler dans un système complètement pré-équilibré à une activité en eau donnée, pour pouvoir facilement comparer des résultats. Avec le 1-BuOH, c'est possible car il est partiellement miscible à l'eau.

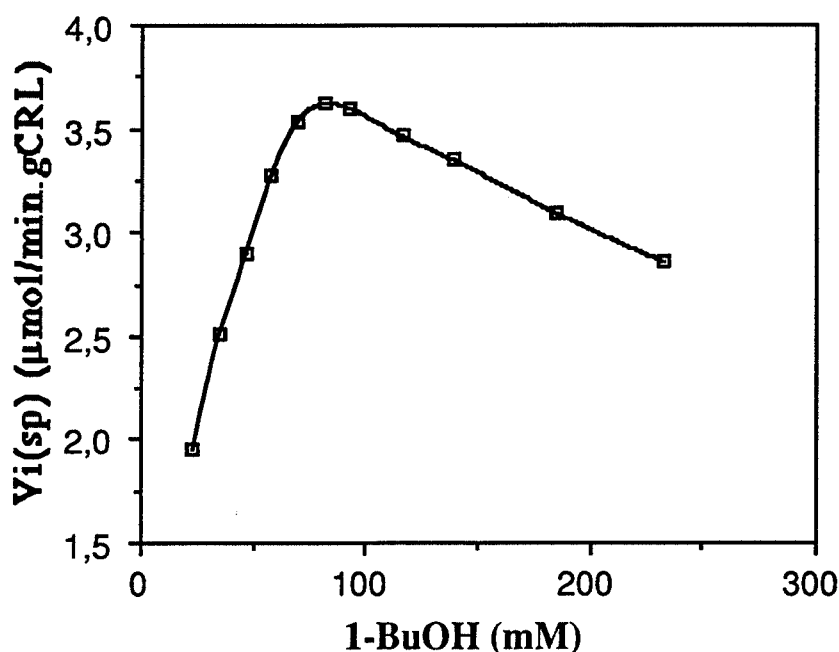
Le suivi de la  $Vi(sp)$  dans ce cas pour différentes concentrations en 1-BuOH est présenté dans la Figure D.1.2.3.a. Des conditions identiques ont été employées pour pouvoir comparer ces résultats avec ceux obtenus précédemment. Mais, la CRL provient d'un nouveau lot, et la comparaison n'est pas possible car les  $Vi(sp)$  observées avec ce nouveau



lot sont plus fortes, bien que l'activité hydrolytique indiquée sur le flacon soit la même. De même, l'eau adsorbée est plus importante, soit 0,062 au lieu de 0,046 g/gCRL.

L'allure de la courbe avec la nouvelle CRL est cependant similaire, avec un optimum pour une concentration en 1-BuOH de 81,3 mM. Cette différence de  $V_i(sp)$  optimale par rapport aux  $V_i(sp)$  optimales précédentes est la conséquence, sans doute, d'un nombre de points expérimentaux plus important. En particulier, aucun essai auparavant n'a été réalisé avec une concentration en 1-BuOH de 81,3 mM.

Pouvant maîtriser l'activité de l'eau dans le système, il est maintenant possible de faire une étude cinétique complète et de valider un modèle.



**Figure D.1.2.3.a** : Influence de la concentration en 1-butanol sur la vitesse initiale spécifique.

[BzOH] 50 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane 50/50.

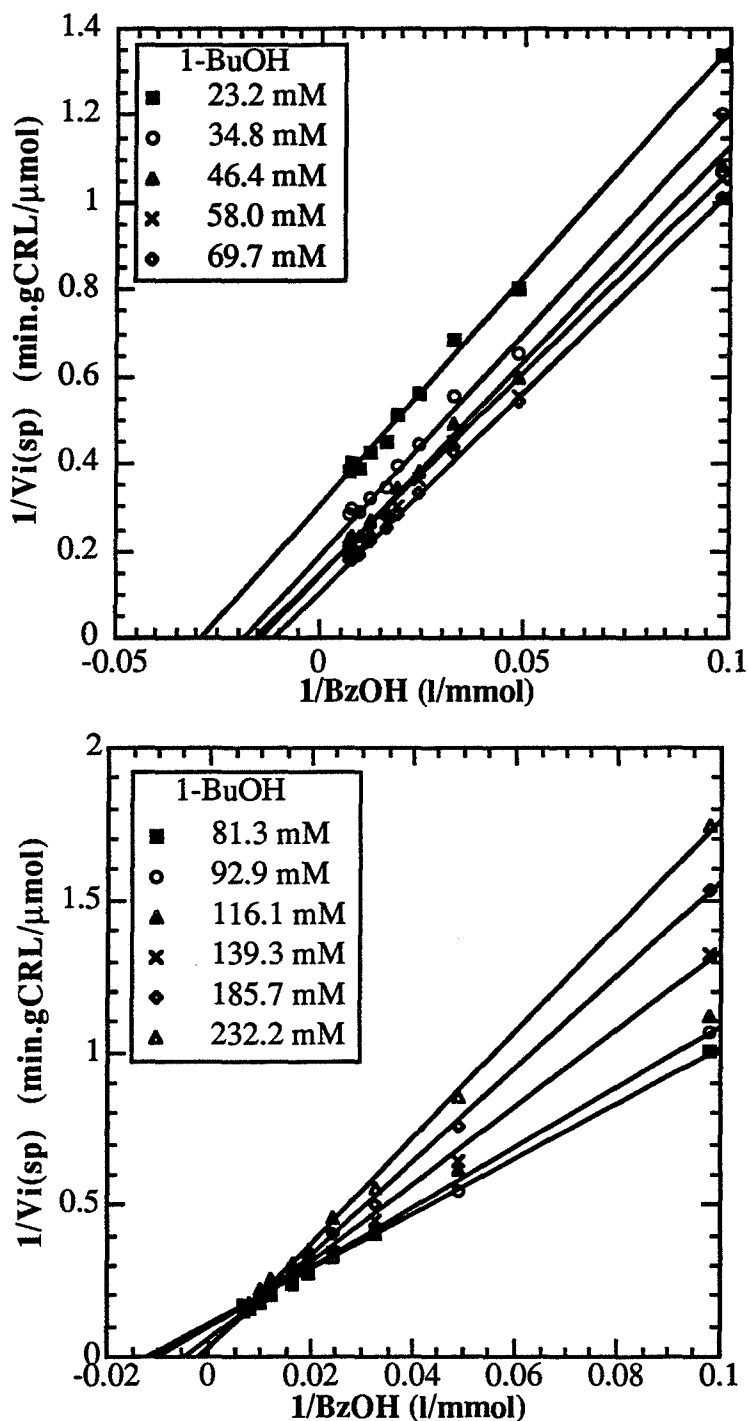
La CRL, le BuOH et les solvants ont été pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.

Eau adsorbée par la CRL : 0,062 g/gCRL.

### D.1.3. Modélisation de la cinétique de réaction

L'objectif principal du chapitre sur le 1-BuOH a été de comprendre le phénomène cinétique, car ceci n'a pas pu être vraiment étudié avec le MeOH (cf paragraphe C.3.3.7.). La grande hydrophilie du MeOH, sa totale miscibilité à l'eau et ses interactions possibles avec l'eau aux faibles concentrations en MeOH sont à l'origine de cet échec. Avec un alcool moins hydrophile tel le 1-BuOH, il est possible de contourner ces difficultés en pré-équilibrant tout le système à une activité en eau donnée. Ceci est possible car l'eau est

partiellement miscible au 1-BuOH : la solubilité de l'eau dans le 1-BuOH est de 19,7% (g/g) à 20°C.



**Figures D.1.3.a et D.1.3.b** : Représentation de Lineweaver-Burk permettant de déterminer les pentes expérimentales.

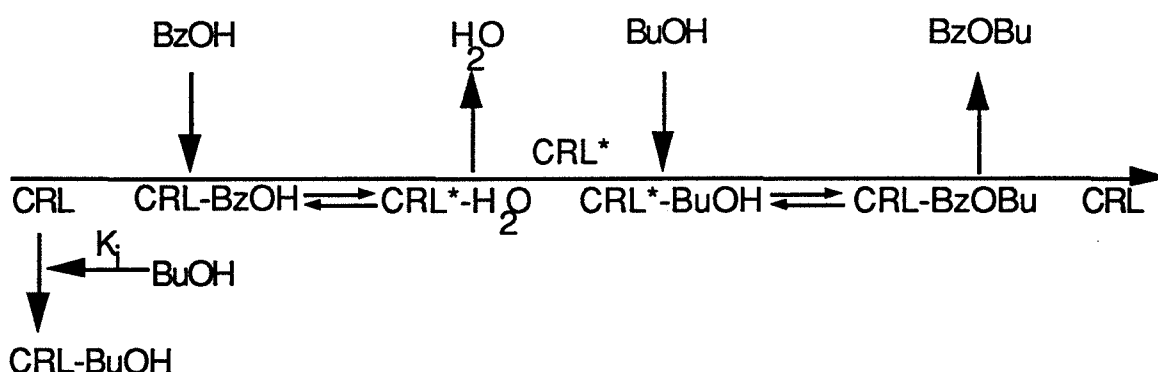
*Toluène/hexane 50/50, CRL brute 10 g/l.*

*Les solvants, le 1-BuOH et la CRL ont été pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.*

Avec la représentation de Lineweaver-Burk en double inverse (Figures D.1.3.a et D.1.3.b), il est parfaitement visible que les points, pour une même concentration en

1-BuOH, sont alignés. Par ailleurs, la pente de chaque droite varie en fonction de la concentration en alcool. Pour de faibles concentrations en 1-BuOH, des droites quasi parallèles peuvent être distinguées (Figure D.1.3.a). Ensuite, à partir de 69,7 mM, la valeur de la pente augmente avec la concentration en 1-BuOH (Figure D.1.3.b). Ceci suggère un mécanisme réactionnel de type Bi Bi Ping Pong avec inhibition par le 1-BuOH (Chulalaksananukul 1992). Le mécanisme sans inhibition a déjà été détaillé dans la partie bibliographique (cf paragraphe A.7.2.). Les résultats obtenus suggèrent une étape supplémentaire où le 1-BuOH agit uniquement sur la forme libre de la CRL pour donner un complexe inactif, et n'agit pas sur l'intermédiaire acyl-enzyme.

Le schéma réactionnel est donc le suivant :



avec BuOH : 1-butanol; BzOBu : benzoate de 1-butyle; CRL\*-H<sub>2</sub>O : complexe (acyl-CRL)-(H<sub>2</sub>O); CRL\* : intermédiaire acyl-CRL; CRL\*-BuOH : complexe (acyl-CRL)-(1-BuOH); CRL-BuOH : complexe (CRL)-(1-BuOH) inactif.

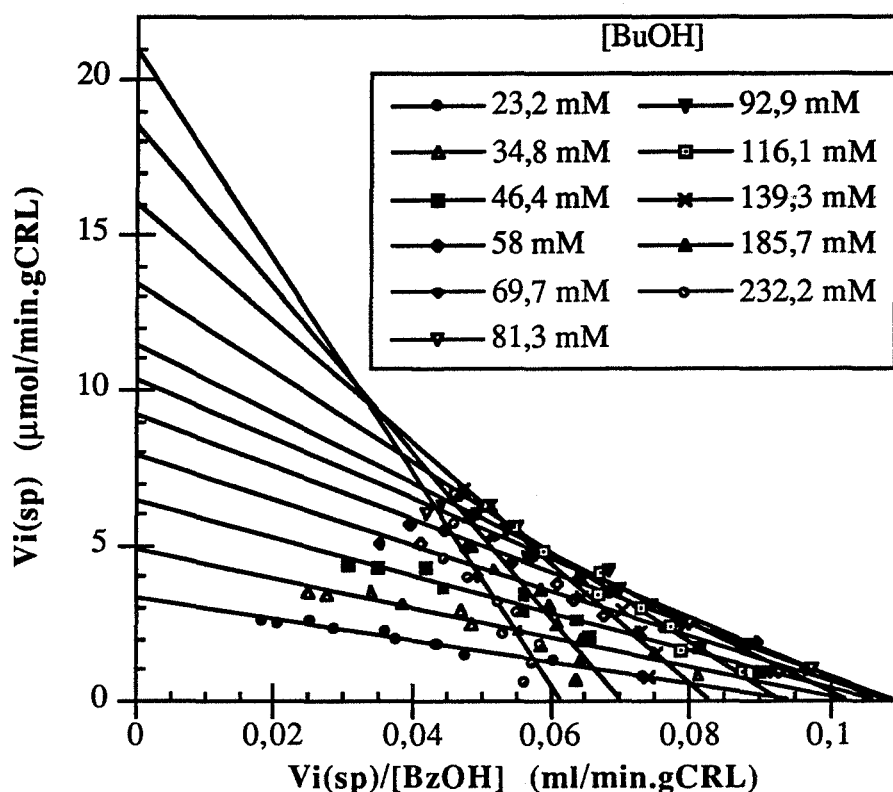
L'équation cinétique de ce mécanisme réactionnel est de la forme (Chulalaksananukul 1992) :

$$\frac{V_{i(sp)}}{V_{m(sp)}} = \frac{[BzOH][BuOH]}{[BzOH](K_{M(BuOH)} + [BuOH]) + x_{(BuOH)}K_{M(BzOH)}[BuOH](1 + \frac{[BuOH]}{K_i})}$$

avec  $V_{m(sp)}$  vitesse initiale spécifique maximale,  $K_{M(BuOH)}$ ,  $K_{M(BzOH)}$  et  $K_i$  respectivement la constante d'affinité du 1-BuOH, la constante d'affinité de BzOH et la constante d'inhibition du 1-BuOH.

Ce modèle comporte donc 4 inconnues,  $V_{m(sp)}$ ,  $K_{M(BuOH)}$ ,  $K_{M(BzOH)}$  et  $K_i$ , à déterminer. Elles peuvent être obtenues en travaillant en double inverse. Cependant, pour avoir plus de précision sur ces différentes valeurs, il est préférable d'employer la

représentation de Woolf-Augustinsson-Hofstee. Celle-ci correspond au tracé de  $V_i(\text{sp})$  en fonction de  $V_i(\text{sp})/[\text{BzOH}]$  (Figure D.1.3.c). Nous obtenons ainsi des droites décroissantes dont l'ordonnée et l'abscisse à l'origine sont respectivement égales à  $\frac{V_m}{1+K_{M(\text{BuOH})}/[\text{BuOH}]}$  et  $\frac{V_m}{K_{M(\text{BzOH})(1+[\text{BuOH}]/K_i)}$ .



**Figure D.1.3.c :** Représentation de Woolf-Augustinsson-Hofstee.

Conditions identiques aux Figures D.1.3.a et D.1.3.b.

En traçant l'inverse de l'ordonnée à l'origine en fonction de l'inverse de la concentration en 1-BuOH,  $V_m$  et  $K_{M(\text{BuOH})}$  peuvent être déterminées à partir de la droite formée par les points expérimentaux (Figure D.1.3.d). Elles sont respectivement égales à  $62 \mu\text{mol/min.gCRL}$  et  $405 \text{ mM}$ .

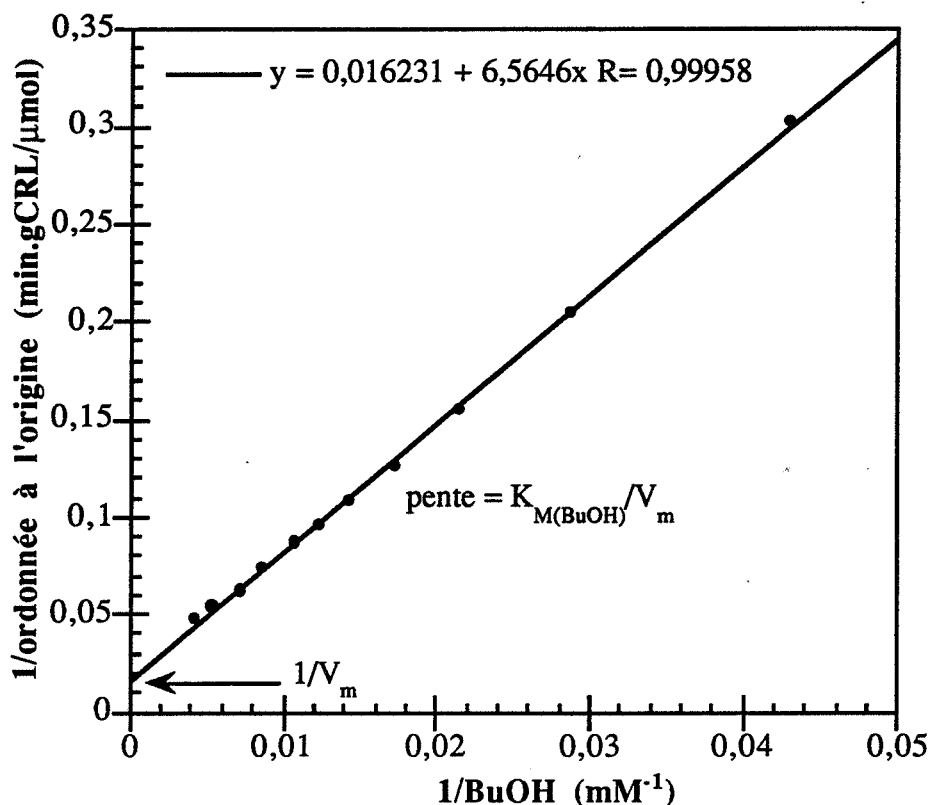


Figure D.1.3.d : Détermination graphique de  $V_m$  et  $K_M(\text{BuOH})$ .

Conditions identiques aux Figures D.1.3.a et D.1.3.b.

Connaissant  $V_m$ , il est maintenant possible de déterminer  $K_M(\text{BzOH})$  et  $K_i$  en traçant l'inverse de l'abscisse à l'origine en fonction de la concentration en 1-BuOH (Figure D.1.3.e). En théorie, la courbe obtenue doit être une droite. Or, pour des concentrations en 1-BuOH inférieures à 81,3 mM, les points expérimentaux s'écartent de la droite : ils forment un arc de cercle décroissant avec l'augmentation de la concentration en 1-BuOH. Un second phénomène s'ajoute à la cinétique de réaction. La détermination de ces constantes est donc seulement possible à partir des points de concentration en 1-BuOH supérieure ou égale à 81,3 mM.  $K_M(\text{BzOH})$  et  $K_i$  sont respectivement égales à 335 et 115 mM.

Les valeurs apparentes des différentes constantes cinétiques sont regroupées dans le Tableau D.1.3.

Paramètre cinétique	Valeur apparente
$K_i$	115 mM
$V_m$	62 $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$
$K_M(\text{BuOH})$	405 mM
$K_M(\text{BzOH})$	335 mM

Tableau D.1.3 : Paramètres cinétiques apparents du modèle obtenus graphiquement.

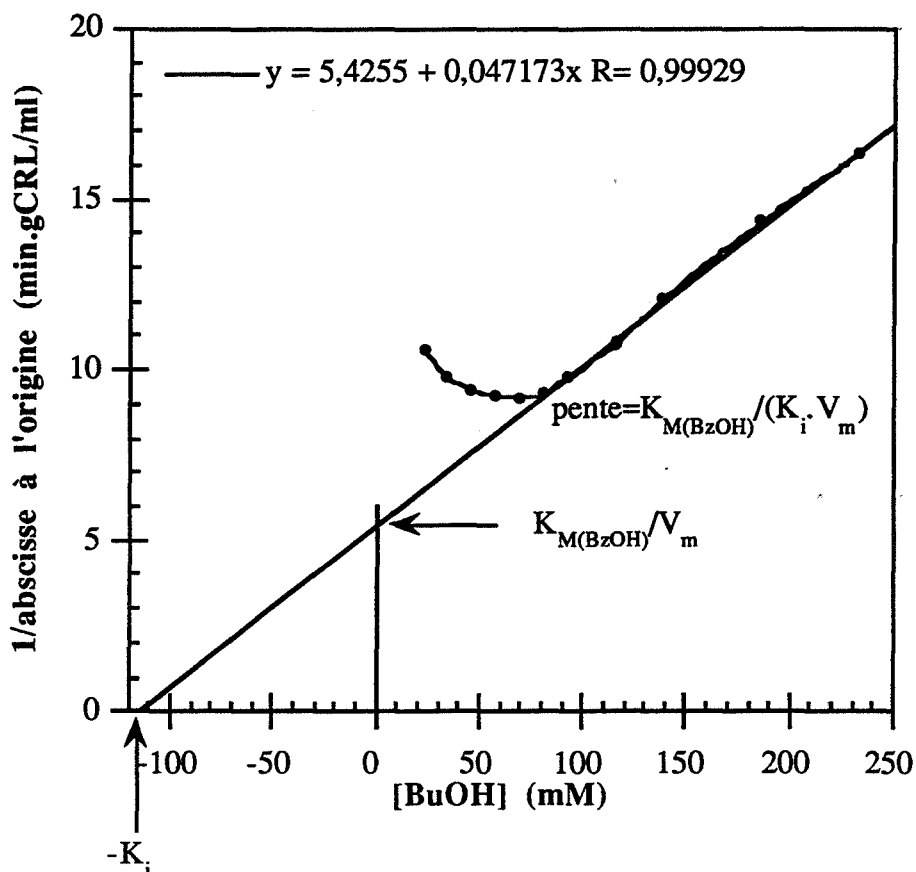


Figure D.1.3.e : Détermination de  $K_M(\text{BzOH})$  et de  $K_i$ .

Conditions identiques aux Figures D.1.3.a et D.1.3.b.

En comparant les courbes obtenues par le modèle et les valeurs expérimentales, nous constatons qu'à partir de 81,3 mM en 1-BuOH, les valeurs expérimentales sont très proches de celles obtenues à l'aide du modèle cinétique. Cependant, entre 10,2 et 69,7 mM de 1-BuOH, le modèle surestime les valeurs de  $V_i(\text{sp})$  (Figure D.1.3.f). Cette valeur limite de 81,3 mM est la même que lors de la détermination de  $K_M(\text{BzOH})$  et de  $K_i$  (Figure D.1.3.e). Ce décalage est attribué à un phénomène supplémentaire qui s'ajoute à la cinétique d'estérification. Il semble qu'au moins un des paramètres de l'équation cinétique n'est pas constant et est dépendant de la concentration en 1-BuOH puisque cet écart avec le modèle, faible pour 69,7 mM en 1-BuOH, augmente avec la diminution de la concentration en 1-BuOH (Figure D.1.3.f).

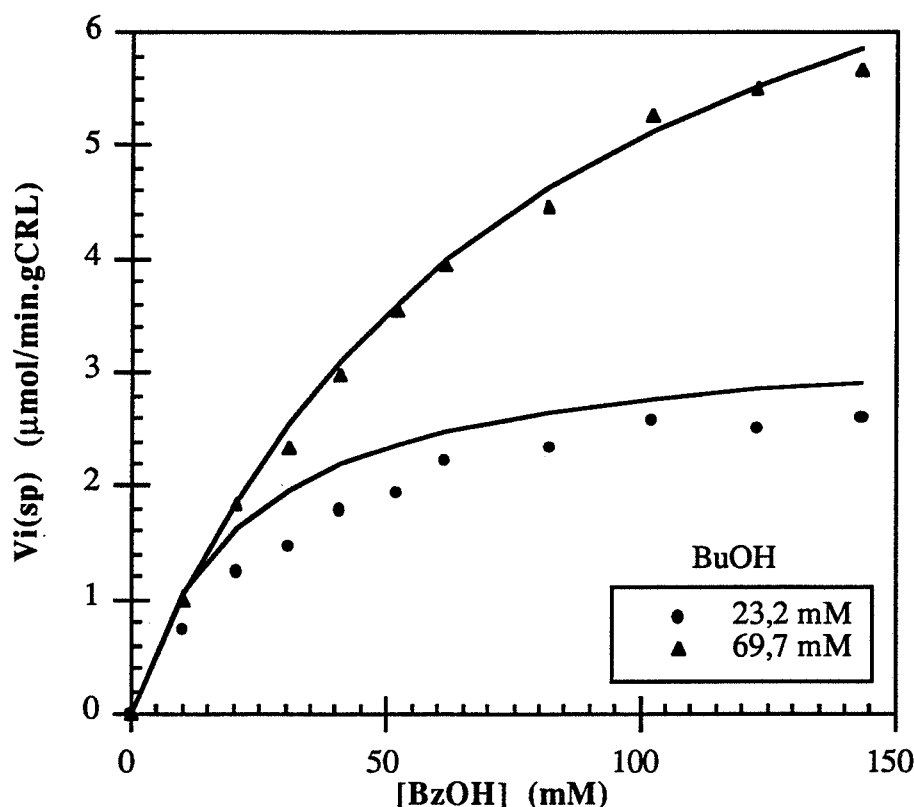
Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer cet écart, mais seule la variation de  $K_i$  ou de  $K_M(\text{BzOH})$  avec la concentration en 1-BuOH semble correspondre à cet écart. Or, ces paramètres cinétiques ne doivent pas varier avec la concentration en 1-BuOH. En examinant de plus près l'équation cinétique, une explication plus probable apparaît. En effet, au lieu de considérer une variation de  $K_M(\text{BzOH})$  en fonction de 1-BuOH due à un facteur  $x(\text{BuOH})$  variant avec la concentration en 1-BuOH, ce qui, dans un premier

temps avait été supposé, une simple manipulation mathématique permet de transférer cette variation à la concentration en BzOH :

$$\frac{V_{i(sp)}}{V_{m(sp)}} = \frac{[BzOH][BuOH]}{[BzOH](K_{M(BuOH)} + [BuOH]) + x_{(BuOH)}K_{M(BzOH)}[BuOH](1 + \frac{[BuOH]}{K_i})}$$

$$\frac{V_{i(sp)}}{V_{m(sp)}} = \frac{y_{(BuOH)}[BzOH][BuOH]}{y_{(BuOH)}[BzOH](K_{M(BuOH)} + [BuOH]) + K_{M(BzOH)}[BuOH](1 + \frac{[BuOH]}{K_i})}$$

avec  $y_{(BuOH)} = \frac{1}{x_{(BuOH)}}$ .



**Figure D.1.3.f** : Exemple d'écarts entre valeurs expérimentales et modèle cinétique pour 23,2 et 69,7 mM de 1-BuOH.

Conditions identiques aux Figures D.1.3.a et D.1.3.b.

Les points correspondent aux valeurs expérimentales. Les courbes représentent les valeurs obtenues par le modèle cinétique.

Ceci revient à dire que, lorsque la concentration en 1-BuOH est inférieure à 81,3 mM, la concentration en BzOH intervenant dans la cinétique d'estérification n'est pas la concentration de BzOH dans la phase organique, mais une valeur pondérée, que nous appellerons concentration en BzOH dans la couche aqueuse, soit  $[BzOH]_{aq}$ . Celle-ci est

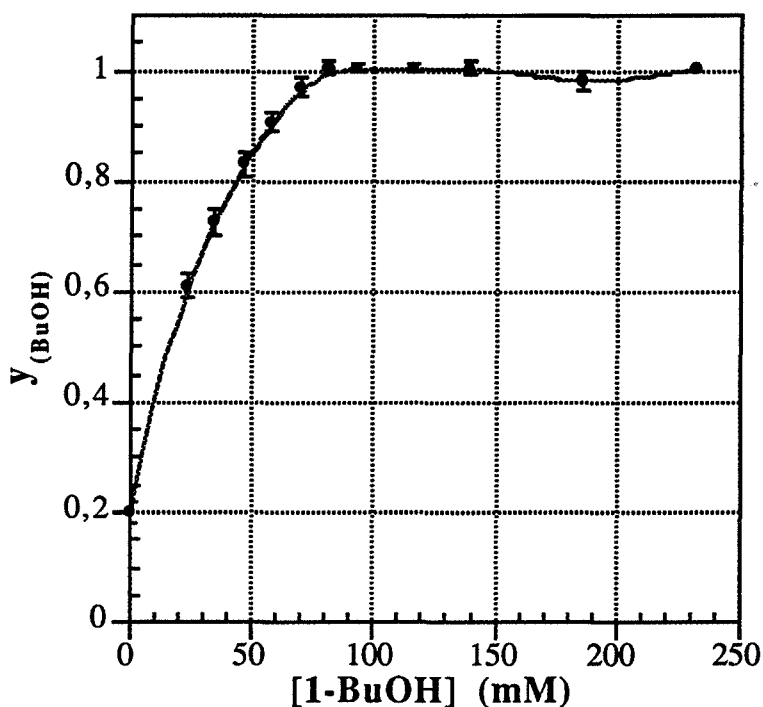
définie par  $[BzOH]_{aq} = y(BuOH) \cdot [BzOH]_{org}$ , avec  $[BzOH]_{org}$  la concentration en BzOH dans la phase organique, et  $y(BuOH)$  un coefficient variant avec le 1-BuOH.

Cette explication est à mettre en relation avec le coefficient de partage de BzOH entre la phase organique et la pellicule aqueuse entourant la CRL. En effet, par définition,  $y(BuOH)$  doit être inversement égal au coefficient de partage de BzOH entre la phase organique et la phase aqueuse pour une concentration en 1-BuOH donnée. Ce coefficient de partage est dépendant de la concentration en 1-BuOH dans le système, et plus particulièrement dans la pellicule aqueuse. Augmenter la concentration en 1-BuOH dans le système, et donc dans la pellicule aqueuse, revient à augmenter la solubilité de BzOH dans la pellicule aqueuse, et donc à diminuer le coefficient de partage de BzOH. L'écart entre valeurs expérimentales et du modèle diminue avec l'augmentation de 1-BuOH dans le système. Une concentration de 81,3 mM en 1-BuOH correspond donc à une limite où le coefficient de partage de BzOH dans le système, dépendant jusqu'à ce point de la concentration en 1-BuOH, devient égal à 1 et, par conséquent, la concentration en BzOH dans la pellicule aqueuse dépend uniquement de la concentration en BzOH dans la phase organique. A notre connaissance, aucun phénomène identique n'a été mis en évidence jusqu'à présent, avec d'autres substrats. Nous ne savons pas expliquer ce changement de comportement du système catalytique à cette valeur précise de concentration en 1-BuOH. Il faudrait peut-être se pencher sur la variation du coefficient de partage de 1-BuOH. La limite de solubilité de 1-BuOH ou de BzOH dans la pellicule aqueuse pourrait peut-être également expliquer ce changement de comportement cinétique à 81,3 mM. En particulier, la concentration du 1-BuOH dans la pellicule aqueuse, pour 81,3 mM de 1-BuOH dans la phase organique est égale à 404 mM ( $P = 0,55$ ). Or, la solubilité de BzOH dans le 1-BuOH, déterminée au laboratoire à 37°C, est égale à 1 g pour 2,2 ml de 1-BuOH, soit une solubilité de BzOH dans la pellicule aqueuse de 49,5 mM. Cette valeur est proche de la limite de solubilité de BzOH dans l'eau à 40°C égale à 6 g/l, soit 49,1 mM (the Merck Index 1989).

Il est possible de montrer l'influence de la concentration en 1-BuOH sur le coefficient  $y(BuOH)$ , égal à  $[BzOH]_{aq}/[BzOH]_{org}$  (Figure D.1.3.g). Par définition,  $y(BuOH)$  est inversement égal à  $P(BzOH)$ , le coefficient de partage de BzOH entre la phase organique et la pellicule aqueuse. En extrapolant  $y(BuOH)$  pour une concentration en 1-BuOH nulle, nous devrions retrouver l'inverse du coefficient de partage de BzOH entre un mélange équivolumique hexane/toluène et l'eau. Or, la valeur calculée à partir des données de Halling (1989b), égale à 1,53, ne donne pas une extrapolation correcte. C'est pourquoi la valeur de  $P(BzOH)$  a dû être déterminée au laboratoire : elle est égale à 5,0. En fait, le coefficient de partage de BzOH dans un système toluène pur/eau donné dans la littérature est faux (valeur donnée à 2,63 alors qu'expérimentalement, nous trouvons 9,65). L'inverse de  $P(BzOH)$ , égal à 0,2, correspond à la valeur extrapolée de  $y(BuOH)$  pour une concentration en 1-BuOH



nulle. La Figure D.1.3.g montre que le 1-BuOH intervient sur  $P(\text{BzOH})$  lorsque sa concentration est inférieure à 81,3 mM. A partir de cette concentration,  $y(\text{BuOH})$  est constant et égal à 1, c'est-à-dire que la concentration en BzOH dans la pellicule aqueuse n'est plus dépendante de la concentration en 1-BuOH, mais uniquement de la concentration en BzOH dans la phase organique.

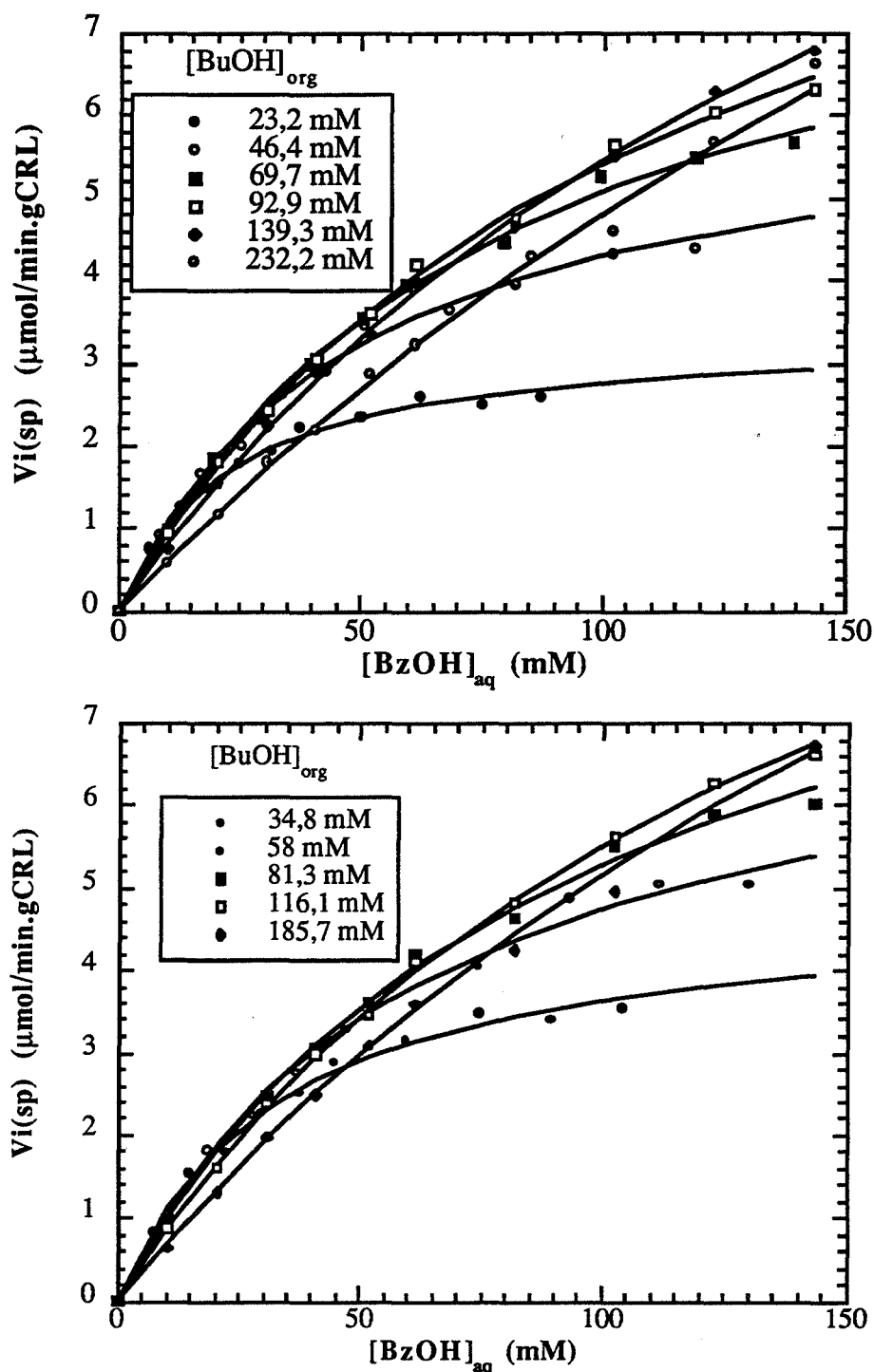


**Figure D.1.3.g :** Influence de la concentration en 1-BuOH dans la phase organique sur  $y(\text{BuOH}) = [\text{BzOH}]_{\text{aq}} / [\text{BzOH}]_{\text{org}}$ .

*Conditions identiques aux Figures D.1.3.a et D.1.3.b.*

En prenant en compte ce facteur correctif sur la concentration en BzOH, il est possible de comparer à nouveau le modèle et les valeurs expérimentales (Figures D.1.3.h et D.1.3.i). L'erreur relative moyenne entre le modèle cinétique et les points expérimentaux est alors faible et égale à 2,7% avec un maximum de 9,3% sur 109 points expérimentaux.

Par conséquent, le modèle Bi Bi Ping Pong avec inhibition par le 1-BuOH décrit correctement la cinétique de réaction si un terme correcteur est introduit dans l'équation cinétique pour la concentration en BzOH. Ce terme est dépendant de la concentration en 1-BuOH lorsque celle-ci est inférieure à 81,3 mM. En effet, pour ces concentrations, le 1-BuOH influe sur le partage de BzOH entre la phase organique et la pellicule d'eau. La concentration en BzOH en contact avec les sites actifs n'est de ce fait pas proportionnelle à sa concentration dans la phase organique à cause de la présence de 1-BuOH dans la phase aqueuse. A partir de 81,3 mM en 1-BuOH, le coefficient correcteur est égal à 1, c'est-à-dire que le coefficient de partage de BzOH est alors indépendant de la concentration en 1-BuOH.



**Figures D.1.3.h et D.1.3.i : Validation du modèle cinétique.**

*Conditions identiques aux Figures D.1.3.a et D.1.3.b.*

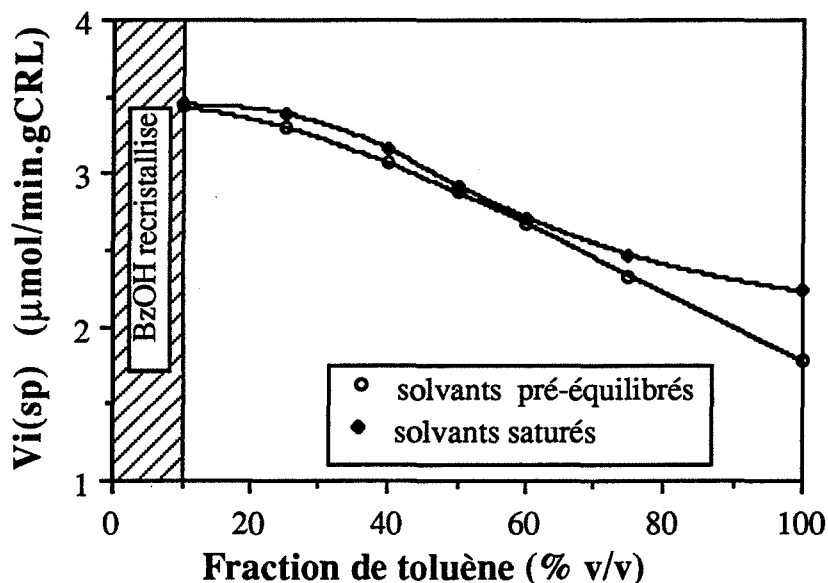
Les points correspondent aux valeurs expérimentales pondérées par le facteur  $\gamma(\text{BuOH})$ . Les courbes représentent les valeurs obtenues par le modèle cinétique.

Les valeurs des constantes cinétiques sont apparentes, car la diffusion des substrats à l'intérieur de la poudre enzymatique vers les sites actifs n'a pas été prise en compte. De même, comme nous l'avons vu, il faut faire intervenir les coefficients de partage des substrats, car nous avons pris seulement en considération les concentrations en substrats

dans la phase organique dans l'équation cinétique. Les constantes cinétiques apparentes intègrent donc en plus les coefficients de partage du 1-BuOH. Nous avons, par ailleurs, confirmé que la répartition de BzOH n'a pas d'influence sur la concentration en 1-BuOH dans la pellicule aqueuse en introduisant un second facteur correcteur  $z(\text{BzOH})$  dans l'équation cinétique pour la concentration en 1-BuOH. Ce coefficient  $z(\text{BzOH})$  est constant et égal à 1.

#### D.1.4. Influence de la fraction de toluène dans le milieu organique sur la réaction

La fraction de toluène dans le milieu organique a une influence non négligeable sur la  $V_i(\text{sp})$  (Figure D.1.4.a). Ceci avait déjà été mis en évidence avec le MeOH (cf paragraphe C.3.4.5.). Le comportement de la CRL en présence de 1-BuOH est toutefois légèrement différent, puisqu'aucune décroissance n'est observée pour de faibles fractions de toluène. Par contre, la  $V_i(\text{sp})$  tend à un maximum vers 10% (v/v) de toluène. Cette décroissance de la  $V_i(\text{sp})$  avec l'augmentation de la fraction de toluène dans un système totalement pré-équilibré est principalement le résultat d'une répartition différente des substrats entre les phases organique et enzymatique.



**Figure D.1.4.a** : Influence de la fraction de toluène dans le milieu organique hexane/toluène et de son hydratation sur la  $V_i(\text{sp})$ .

$[\text{BzOH}]$  50 mM,  $[1\text{-BuOH}]$  92,9 mM, CRL 10 g/l.

Le 1-BuOH et la CRL sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.

L'hexane et le toluène sont, soit pré-équilibrés à  $a_w$  0,65, soit saturés en eau.

La variation du coefficient de partage de BzOH dans le système a déjà été présentée dans le paragraphe C.3.3.5, avec le MeOH. Ceci est sans doute l'explication principale de

cette décroissance. Cependant, le coefficient de partage du 1-BuOH est également fonction de la nature du milieu organique. Il a été déterminé au laboratoire et est égal respectivement à 0,18 et 0,85 pour les systèmes hexane/eau et toluène/eau. Le 1-BuOH se retrouve donc, dans tous les cas, majoritairement dans la phase aqueuse (cependant moins que le méthanol). Par ailleurs, plus le mélange de solvants contient d'hexane, plus le partage de l'alcool est favorable pour la phase aqueuse. La variation des coefficients de partage des substrats en fonction de la nature du milieu organique est donc l'explication la plus plausible de cette évolution de  $V_i(sp)$ . Etant donné que l'inhibition apparaît pour des concentrations en 1-BuOH plus importantes que celles en MeOH, la phase de décroissance pour de faibles fractions en toluène n'est pas observable : la limite d'inhibition par le 1-BuOH n'est sans doute pas atteinte.

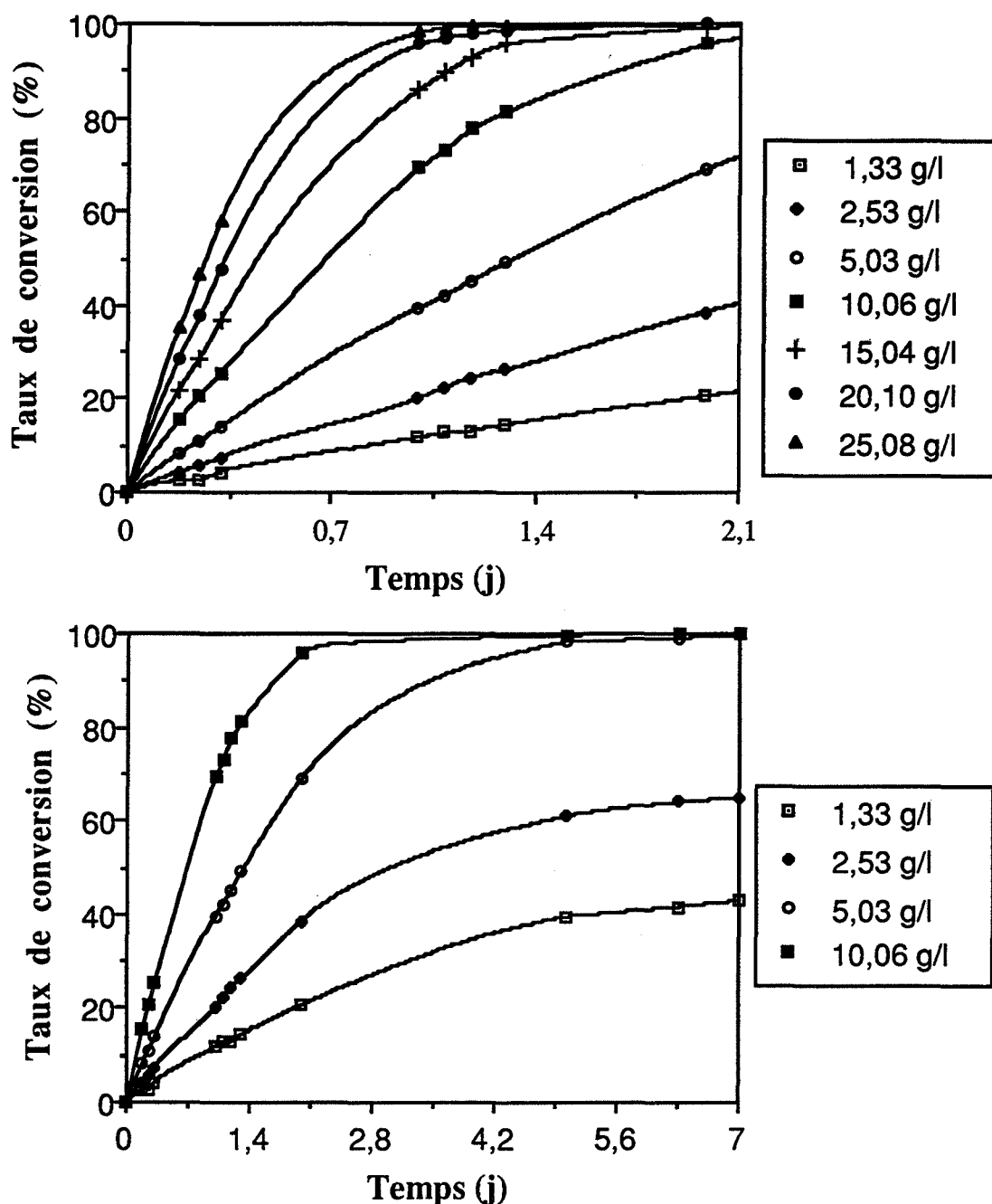
Le degré d'hydratation des solvants influe également sur  $V_i(sp)$ , surtout pour des fractions de toluène supérieures à 60%. Pour des valeurs inférieures, les  $V_i(sp)$  sont peu différentes : la  $V_i(sp)$  obtenue avec des solvants saturés est légèrement supérieure, bien que cette différence reste dans la limite de l'erreur de mesure de 2%.

En travaillant avec un système totalement pré-équilibré à  $a_w$  0,65,  $V_i(sp)$  diminue proportionnellement à la fraction de toluène lorsque la proportion de toluène est comprise entre 50 et 100%. En effet, cette linéarité disparaît pour des valeurs de toluène inférieures à 50%. Un maximum n'a pu être décelé car, pour des valeurs inférieures à 10%, le BzOH recristallise.

En employant des solvants saturés en eau, l'allure de la courbe devient sigmoïdale, et l'écart avec la courbe obtenue avec des solvants pré-équilibrés à  $a_w$  0,65 augmente pour des fractions de toluène supérieures à 60% (v/v). En effet, pour une même proportion de toluène dans ce domaine, les  $V_i(sp)$  obtenues avec les solvants saturés sont plus importantes. Ceci est la conséquence d'un apport d'eau plus important par le toluène saturé. En diminuant la fraction de toluène, les quantités d'eau apportées par les solvants saturés et pré-équilibrés deviennent très proches. En effet, l'hexane, même saturé, n'apporte pas d'eau, car l'eau est très peu soluble dans l'hexane (solubilité inférieure à 0,004% g/g). Les  $V_i(sp)$  observées sont alors très proches.

Ainsi, l'eau provenant du toluène saturé se répartit dans le réacteur et se retrouve au niveau de la CRL encore non hydratée. L'écart entre les courbes devient de plus en plus important, car cette quantité d'eau augmente avec la fraction de toluène.

### D.1.5. Influence de la teneur en CRL sur la réaction



**Figures D.1.5.a et D.1.5.b :** Evolution des taux de conversion avec la teneur en CRL.

[BzOH] 50 mM, [1-BuOH] 92,9 mM, toluène/hexane 50/50.

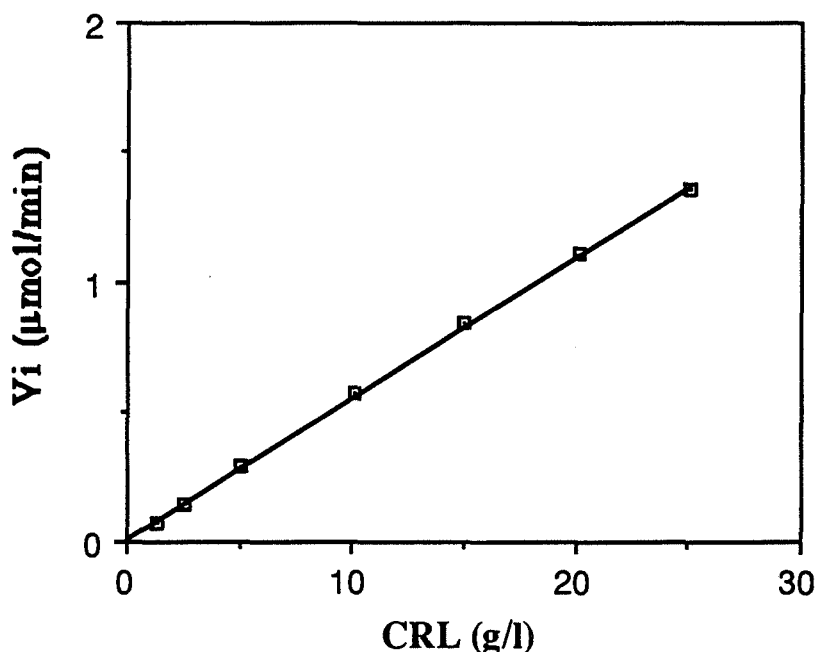
La CRL, le 1-BuOH et les solvants ont été pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.

Augmenter la teneur en CRL permet d'atteindre plus rapidement des taux de conversion quasi quantitatifs (99,8%) (Figure D.1.5.a). En particulier, pour une teneur de 25 g/l, la réaction est terminée après 1 j. En diminuant la teneur en CRL, les temps de réaction sont plus longs. Ainsi, pour 5 g/l, il faut attendre 6,3 j pour atteindre 99,8%

(Figure D.1.5.b). En observant de plus près, la vitesse de réaction diminue rapidement. En effet, il faut 1,4 j pour passer de 99,1 à 99,8%.

Ceci est encore plus perceptible pour 1,3 et 2,5 g/l (Figure D.1.5.b), car la pente de la courbe, c'est-à-dire la vitesse de réaction, diminue très sensiblement après 3,5 j. Les taux de conversion respectifs, atteints après 7 j de réaction (7 j de réaction), ne sont alors que de 43 et 64,9% et ils évoluent très faiblement. La poudre catalytique subit une modification importante lors de ce changement de pente.

En particulier, la morphologie de la poudre est différente et ressemble à celle obtenue après un ajout important d'eau. Cette diminution de vitesse de réaction est ainsi attribuée à une transformation de la poudre de CRL en agrégats limitant l'accès des substrats aux sites catalytiques. De ce fait, l'eau créée lors de l'estérification se retrouve majoritairement autour des grains de CRL : une partie de la CRL peut être considérée, dans une certaine mesure, comme un déshydratant. Ayant atteint la limite d'adsorption d'eau par la CRL, l'excès d'eau alors crée des agrégats de CRL, et la cinétique de réaction est modifiée. De plus, une partie de la CRL colle au fond du tube : il semblerait qu'une "phase aqueuse" concentrée en CRL se forme au fond du tube. En travaillant avec plus de CRL (teneur supérieure à 5 g/l), ce changement de morphologie n'est pas réellement observable.

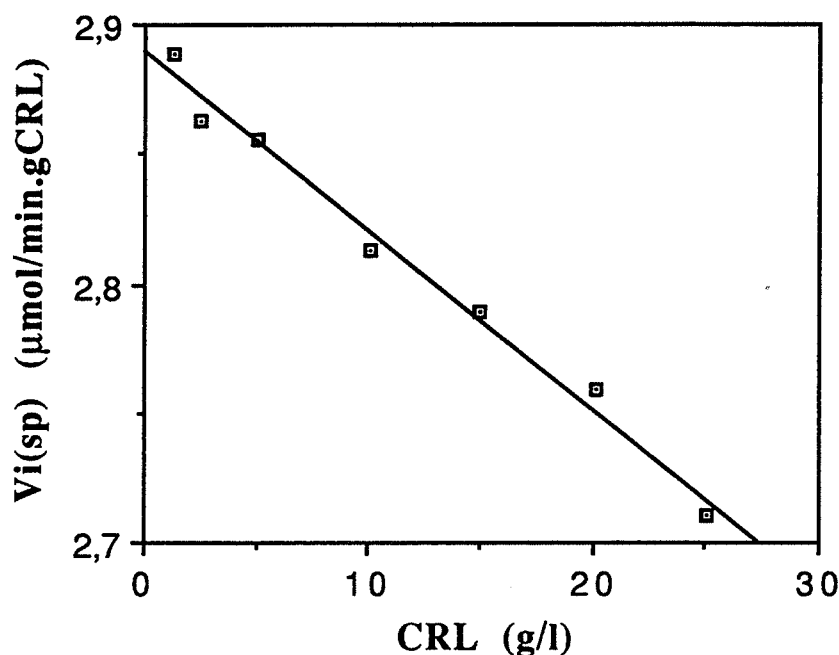


**Figure D.1.5.c :** Effet de la teneur en CRL sur la vitesse initiale.

*Conditions identiques à la Figure D.1.5.a.*

La  $V_i$  augmente linéairement avec la teneur en CRL (Figure D.1.5.c). Les cinétiques qui avaient été obtenues avec le MeOH (cf paragraphes C.3.3.8. et C.3.4.2.) ne sont donc pas observables avec le 1-BuOH dans un système totalement pré-équilibré à  $a_w$  0,65. Ceci vient sans doute du fait que le 1-BuOH peut être pré-équilibré par notre méthode de pré-équilibrage.

La  $V_i(sp)$ , par contre, décroît linéairement avec la teneur en CRL (Figure D.1.5.d). Cette décroissance est très faible (inférieure à 6% en passant de 1,33 à 25 g/l de CRL).



**Figure D.1.5.d :** Effet de la teneur en CRL sur la vitesse initiale spécifique.  
*Conditions identiques à la Figure D.1.5.a.*

3 hypothèses peuvent expliquer celle-ci :

- Tout d'abord, l'hydratation de la poudre catalytique par pré-équilibrage pourrait ne pas être terminée après 48 h pour de fortes teneurs en CRL. Or, après avoir vérifié la quantité d'eau adsorbée après 48 h, celle-ci ne varie plus et est proportionnelle à la quantité de CRL. La quantité d'eau adsorbée est égale à 0,046 g/gCRL. Ce n'est donc pas un problème d'hydratation.

- Par ailleurs, cette faible chute pourrait être le résultat de limitations diffusionnelles vers les sites catalytiques. En particulier, en augmentant la quantité de CRL, la densité des particules de CRL est plus importante, provoquant collisions, agrégations, et donc accès limité aux sites catalytiques.

- Enfin, cette décroissance serait la conséquence d'une faible diminution de la concentration en 1-BuOH dans l'environnement aqueux des sites actifs. En effet, la concentration en 1-BuOH utilisée est la concentration pour laquelle la  $V_i(sp)$  est optimale. Or, le volume d'eau apporté par CRL pré-équilibrée augmente proportionnellement avec la teneur en CRL.

C'est cette troisième hypothèse qui est actuellement privilégiée. Avec le MeOH et la CRL pré-équilibrée à  $a_w$  0,65, nous avons déjà mis en avant cette hypothèse. Toutefois, avec le MeOH, la  $Vi(sp)$  est fortement dépendante de la teneur en CRL et, surtout, est fortement croissante avec cette dernière : le partage du MeOH, d'une part, est beaucoup plus favorable pour la phase aqueuse et, d'autre part, le MeOH est déjà inhibiteur pour la concentration utilisée (61,8 mM). Augmenter le volume de la pellicule aqueuse revient à diluer le MeOH dans celle-ci et donc à diminuer l'inhibition, d'où une augmentation de la  $Vi(sp)$  avec l'augmentation de la teneur en CRL.

Par contre, avec le 1-BuOH, la  $Vi(sp)$  est faiblement décroissante avec l'augmentation de la teneur en CRL. Le partage du 1-BuOH est également favorable à la pellicule d'eau, mais beaucoup moins fortement (environ 100 fois moins que le MeOH). C'est pourquoi l'augmentation du volume d'eau diminue faiblement la concentration en 1-BuOH dans la pellicule aqueuse. Etant donné que la concentration totale en 1-BuOH utilisée (92,9 mM) est la concentration pour avoir des  $Vi(sp)$  optimales quelle que soit la teneur en CRL (Figure D.1.5.e), la faible baisse de la concentration de 1-BuOH dans la pellicule aqueuse aboutit à une diminution de la  $Vi(sp)$ .

Il est possible d'estimer la concentration en alcool (1-BuOH ou MeOH) dans la pellicule aqueuse en supposant que :

- le coefficient de partage de l'alcool est affecté de manière négligeable par la présence du BzOH dans le système (ceci a été vérifié dans le paragraphe D.1.3 pour le 1-BuOH),
- le volume d'eau apporté par l'hexane, le toluène et le BzOH est négligeable par rapport à celui apporté par la CRL et l'alcool (les premiers étant moins avides d'eau),
- la quantité d'alcool adsorbée par la CRL est faible,
- les solvants organiques sont insolubles dans la pellicule d'eau.

Nous avons les trois égalités suivantes :

$$[ROH]_0 V_{\text{total}} = [ROH]_{\text{hex/tol}} V_{\text{hex/tol}} + [ROH]_{\text{aq}} V_{\text{aq}}$$

$$V_{\text{total}} = V_{\text{hex/tol}} + V_{\text{aq}}$$

$$P_{(ROH)}^{\text{hex/tol}} = \frac{[ROH]_{\text{hex/tol}}}{[ROH]_{\text{aq}}}$$

avec  $P_{(ROH)}^{\text{hex/tol}}$  coefficient de partage de l'alcool entre le mélange équimolaire hexane/toluène et l'eau,  $V_{\text{total}}$  volume total des phases liquides,  $V_{\text{hex/tol}}$  et  $V_{\text{aq}}$  volumes de la phase organique et de la phase aqueuse,  $[ROH]_0$ ,  $[ROH]_{\text{aq}}$  et  $[ROH]_{\text{hex/tol}}$  les concentrations en



alcool respectivement, introduites initialement dans le flacon, dans la phase aqueuse et dans la phase organique hexane/toluène.

Nous obtenons donc :

$$[\text{ROH}]_{\text{aq}} = [\text{ROH}]_0 \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{hex/tol}} P_{(\text{ROH})}^{\text{hex/tol}} + V_{\text{aq}}}$$

Dans cette expression, tous les composants sont connus ou estimés sauf  $P_{(\text{ROH})}^{\text{hex/tol}}$  qui est le coefficient de partage de l'alcool entre le milieu organique composé d'un mélange équimolaire hexane/toluène et la pellicule aqueuse. Or, c'est le dénominateur qui va influencer grandement sur la concentration en alcool dans la pellicule aqueuse.

Ainsi, si  $P_{(\text{ROH})}^{\text{hex/tol}} \cdot V_{\text{hex/tol}}$  est supérieur à  $V_{\text{aq}}$ , alors  $[\text{ROH}]_{\text{aq}}$  est peu modifiée en augmentant le volume d'eau. Par contre, si ces valeurs sont du même ordre de grandeur ou si  $V_{\text{aq}}$  est supérieur, alors  $[\text{ROH}]_{\text{aq}}$  est fortement dépendante du volume de la pellicule aqueuse.

$P_{(\text{ROH})}^{\text{hex/tol}}$  est compris entre  $P_{(\text{ROH})}^{\text{hex}}$  obtenu pour cet alcool dans un système hexane pur/eau et  $P_{(\text{ROH})}^{\text{tol}}$  dans un système toluène pur/eau. Il peut être estimé en considérant qu'il y a une relation linéaire entre le coefficient de partage dans le mélange et la fraction molaire des solvants dans le même mélange :

$$P_{(\text{ROH})}^{\text{hex/tol}} = x_{\text{hex}} P_{(\text{ROH})}^{\text{hex}} + x_{\text{tol}} P_{(\text{ROH})}^{\text{tol}} \quad (\text{Equation D.1.5})$$

avec  $P_{(\text{ROH})}^{\text{hex/tol}}$ ,  $P_{(\text{ROH})}^{\text{hex}}$  et  $P_{(\text{ROH})}^{\text{tol}}$  les coefficients de partage de l'alcool (ROH) respectivement entre un mélange hexane/toluène et l'eau, entre l'hexane et l'eau et entre le toluène et l'eau,  $x_{\text{hex}}$  et  $x_{\text{tol}}$  les fractions molaires de l'hexane et du toluène dans le milieu organique.

Ces coefficients sont regroupés dans le Tableau D.1.5. Le coefficient de partage pour le 1-BuOH a été calculé par l'équation D.1.5 et déterminé expérimentalement : il est respectivement égal à 0,55 et 0,57. Ces deux valeurs sont assez proches (écart de 3,5%). Par conséquent, l'équation D.1.5 estime bien le coefficient de partage de l'alcool entre le mélange hexane/toluène et l'eau.

Pour le MeOH,  $V_{\text{aq}}$ , volume d'eau apporté par la CRL, est du même ordre de grandeur que  $P_{(\text{MeOH})}^{\text{hex/tol}} V_{\text{hex/tol}}$ . Donc, la concentration du MeOH dans la pellicule aqueuse est fortement dépendante du volume d'eau apporté par la CRL et proportionnelle à la teneur en CRL. Augmenter le volume d'eau dans le système revient à augmenter le dénominateur, c'est-à-dire à diminuer fortement la concentration du MeOH dans la phase aqueuse, d'où une diminution de l'inhibition et une augmentation de la  $V_i(\text{sp})$  en fonction de la teneur en CRL.

ROH	$P_{(ROH)}^{hex}$	$P_{(ROH)}^{tol}$	$P_{(ROH)}^{hex/tol}$
1-BuOH	0,18(1)	0,85(1)	0,55(3) 0,57(1)
MeOH	0,0016(2)	0,0071(2)	0,0046(3)

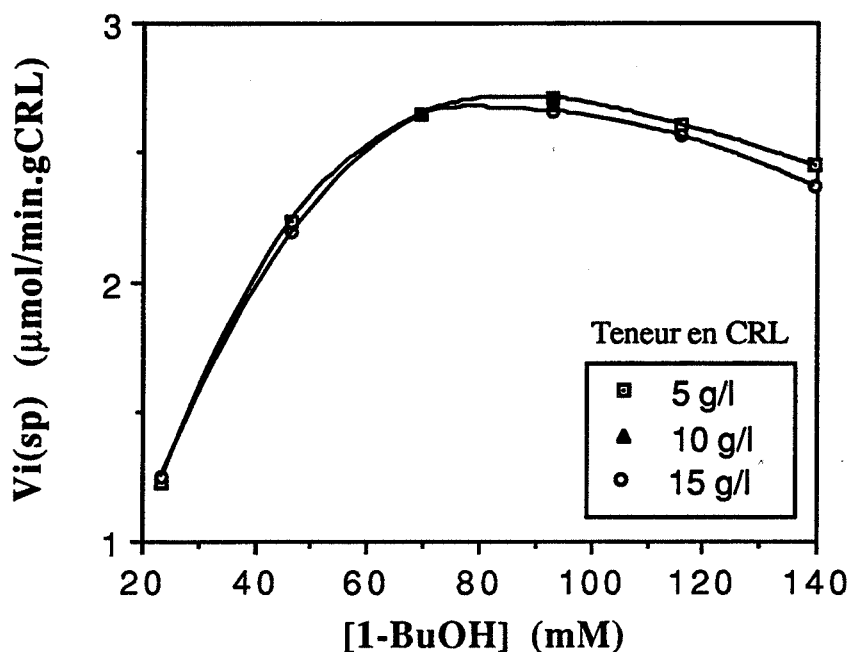
**Tableau D.1.5 :** Estimation de  $P_{(ROH)}^{hex/tol}$  pour le 1-BuOH et le MeOH.

Les coefficients notés (1) sont des valeurs obtenues au laboratoire. Ceux notés (2) sont des valeurs publiées par Halling (1989). Les coefficients notés (3) sont calculés à partir de l'équation D.1.5.

Par contre, pour le 1-BuOH,  $P_{(1-BuOH)}^{hex/tol} V_{hex/tol}$  est très supérieur à  $V_{aq}$ . Par conséquent, la variation de  $V_{aq}$  a une influence faible sur le dénominateur, et donc sur la concentration en 1-BuOH dans la pellicule aqueuse. De plus, contrairement au MeOH, la concentration en 1-BuOH employée est la concentration pour laquelle la  $Vi(sp)$  est optimale (Figure D.1.5.e). Une faible baisse de la concentration en 1-BuOH dans la pellicule aqueuse, due à l'augmentation de  $V_{aq}$ , aboutit donc à une chute faible de  $Vi(sp)$ . De ce fait,  $Vi(sp)$  décroît faiblement avec l'augmentation de la teneur en CRL.

Par ailleurs, dans le chapitre C, il avait été mis en évidence que la teneur en CRL influence directement la cinétique d'estérification de l'acide benzoïque par le MeOH (cf paragraphe C.3.4.2.). Or, il semble que la teneur en CRL n'influe quasiment pas sur la  $Vi(sp)$  d'estérification du BzOH par le 1-BuOH. Il est nécessaire de confirmer cette observation en étudiant la cinétique d'estérification pour 3 teneurs en CRL et différentes concentrations en 1-BuOH (Figure D.1.5.e). Les valeurs du modèle cinétique trouvées dans le paragraphe D.1.3. seront ainsi valables quelle que soit la teneur en CRL.

La  $Vi(sp)$  est très faiblement dépendante de la teneur en CRL (Figure D.1.5.e), et ce quelle que soit la concentration en 1-BuOH utilisée. En effet, les valeurs de  $Vi(sp)$  obtenues pour 5 et 15 g/l sont identiques, aux erreurs de mesure près. Pour 92,9 mM en 1-BuOH, un essai supplémentaire a été réalisé avec une concentration en CRL de 10 g/l. Celui-ci a une  $Vi(sp)$  identique aux essais avec 5 et 15 g/l pour une même concentration en 1-BuOH.



**Figure D.1.5.e :** Influence de la teneur en CRL sur  $V_i(sp)$  pour différentes concentrations en 1-BuOH.

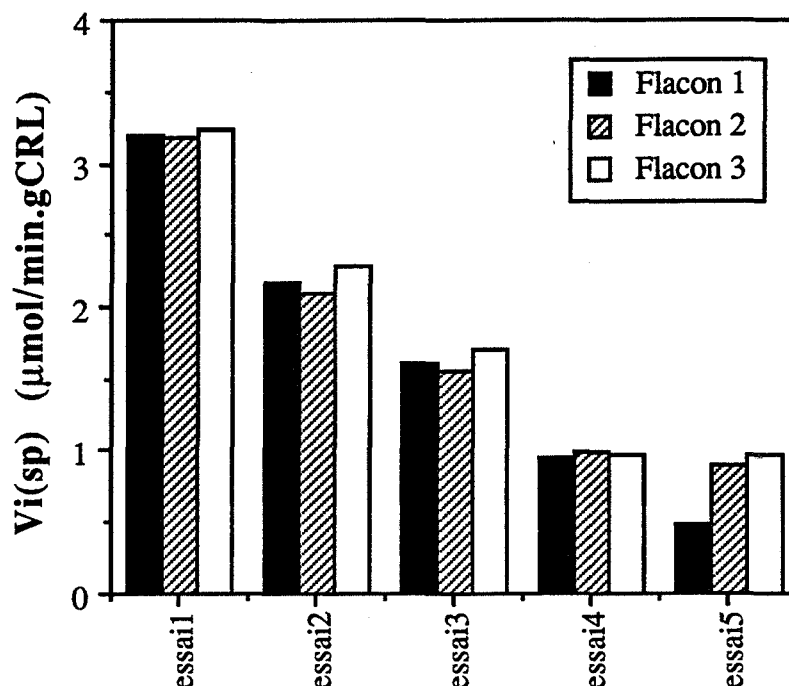
$[BzOH]$  50 mM, toluène/hexane 50/50.

La CRL, le 1-BuOH et les solvants sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.

### D.1.6. Réutilisation de la CRL

La stabilité de l'activité estérasique de la CRL a été également étudiée. Quelques résultats préliminaires avec le MeOH nous indiquent une perte notable d'activité lorsque la CRL est réutilisée. Avec le 1-BuOH, le même phénomène est observé (Figure D.1.6.a). Une part de cette perte d'activité est associée au traitement subi par la poudre enzymatique après chaque essai : élimination du milieu organique par pipetage (perte d'enzyme), lavages à l'acétone, séchage dans le lyophilisateur (perte d'activité). L'autre part est la conséquence de la morphologie de la poudre après chaque réutilisation. En effet, à chaque réutilisation, la réaction est arrêtée lorsque plus de 95% de l'acide benzoïque a réagi. Or, dans ces conditions, la poudre est agglomérée. Les agrégats de poudre enzymatique persistent pendant le séchage dans le lyophilisateur, ce qui limite l'accès aux sites bloqués à l'intérieur des agrégats.

Ceci se traduit par une perte d'activité d'environ 25, 50 et 75% après respectivement la première, la seconde et la troisième réutilisation. A partir de la troisième réutilisation de la CRL, la  $V_i(sp)$  se stabilise à 1  $\mu\text{mol/min.gCRL}$ . Il faut également noter que l'écart-type augmente avec le nombre de réutilisations : ceci est principalement le résultat d'une agglomération différente de la poudre dans les différents flacons.



**Figure D.1.6.a :** Evolution de la  $V_i(sp)$  avec la réutilisation de la CRL.

$[BzOH]$  50 mM,  $[1-BuOH]$  92,9 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane 50/50.

Le 1-BuOH, la CRL et les solvants sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.

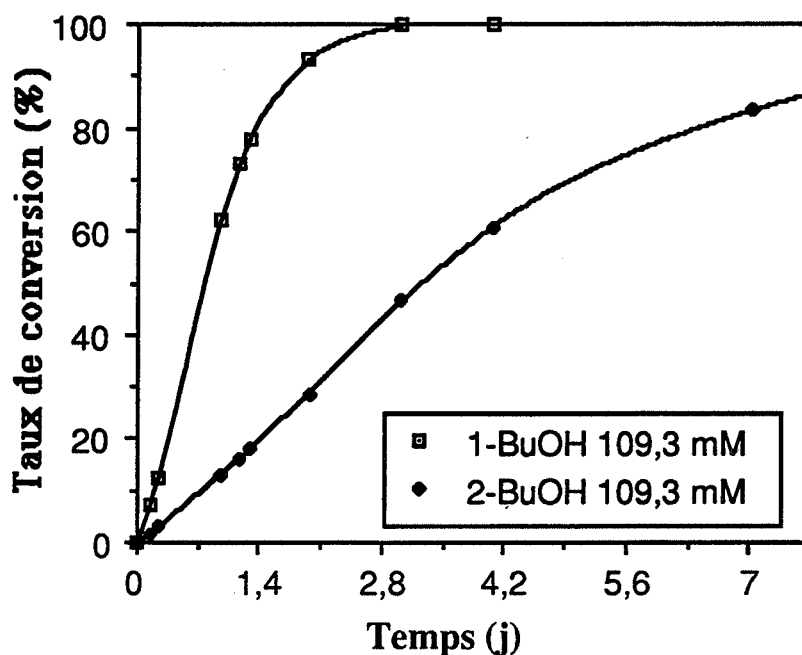
Par conséquent, l'activité enzymatique de la poudre diminue rapidement après la première utilisation. Pour améliorer la stabilité de la poudre, l'immobilisation peut être envisagée. Quelques essais d'immobilisation par adsorption sur célite n'ont donné aucun résultat. L'immobilisation de la CRL pour améliorer sa stabilité n'a pas pu être réalisée faute de temps. Cette immobilisation permettrait de limiter, outre la perte d'activité enzymatique liée à la récupération, les phénomènes d'agglomération de la poudre.

## D.2. LES BENZOATES DE 2-BUTYLE

### D.2.1. Influence de la concentration en 2-butanol racémique

#### D.2.1.1. Influence de la position de la fonction hydroxyle

L'estérification de BzOH par le 2-BuOH est une réaction beaucoup plus lente. En effet, la réaction n'est pas terminée après 7 j de réaction. Seulement 85% de BzOH est alors transformé (Figure D.2.1.1.a). Avec le 1-BuOH, la transformation est complète après 3,1 j de réaction pour la même concentration.



**Figure D.2.1.1.a :** Influence de la structure moléculaire du butanol.

[BzOH] 50 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane 50/50.

La CRL et les solvants sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65. Le 1-BuOH et le 2-BuOH sont prélevés directement dans leur flacon de stockage.

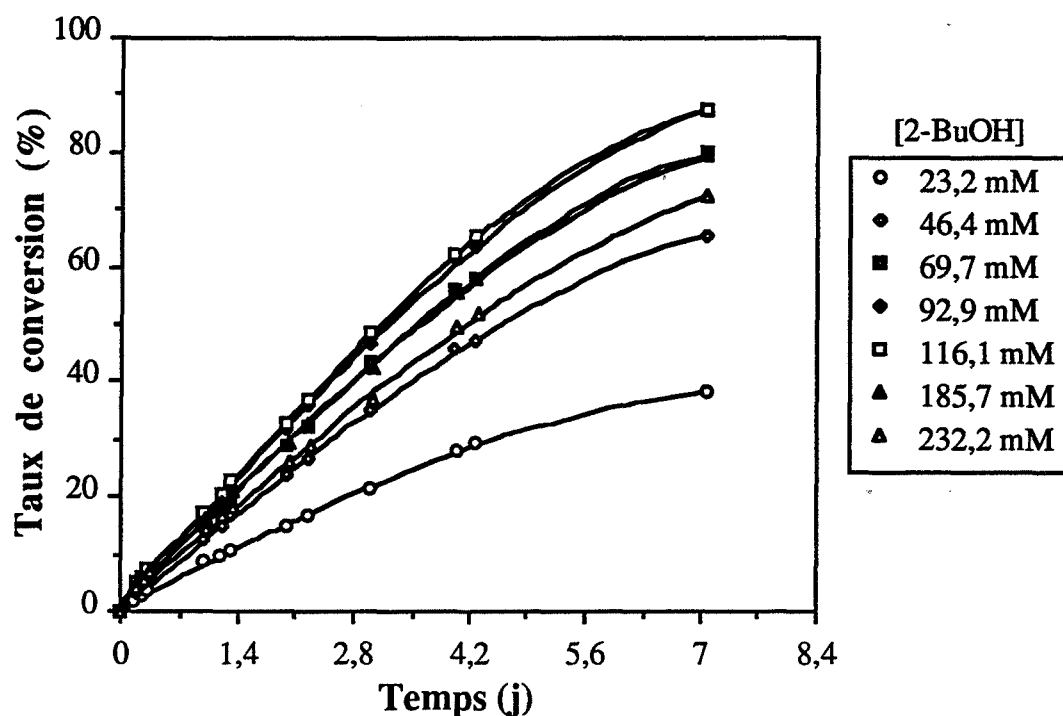
De même, dans les mêmes conditions, la  $Vi(sp)$  est 4 fois plus faible avec le 2-BuOH, soit 0,57 et 2,35  $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$  pour respectivement le 2- et le 1-BuOH.

La CRL est donc sélective vis-à-vis du substrat, car elle transforme plus rapidement l'alcool primaire que l'alcool secondaire. Ce résultat n'est pas nouveau car le 2-BuOH est plus encombrant que le 1-BuOH. La gêne stérique engendrée par la ramification sur le C-2 explique donc cette diminution de réactivité.

#### D.2.1.2. Influence de la concentration en 2-butanol racémique

La réaction avec le 2-BuOH racémique est beaucoup plus lente qu'avec le 1-BuOH. La réaction n'est pas terminée après 7 j quelle que soit la concentration en 2-BuOH introduite (Figure D.2.1.2.a) alors qu'elle est terminée après 3 j de réaction avec le 1-BuOH (Figure non montrée). La vitesse de réaction diminue après 4,2 j de réaction et l'équilibre thermodynamique est très long à atteindre.

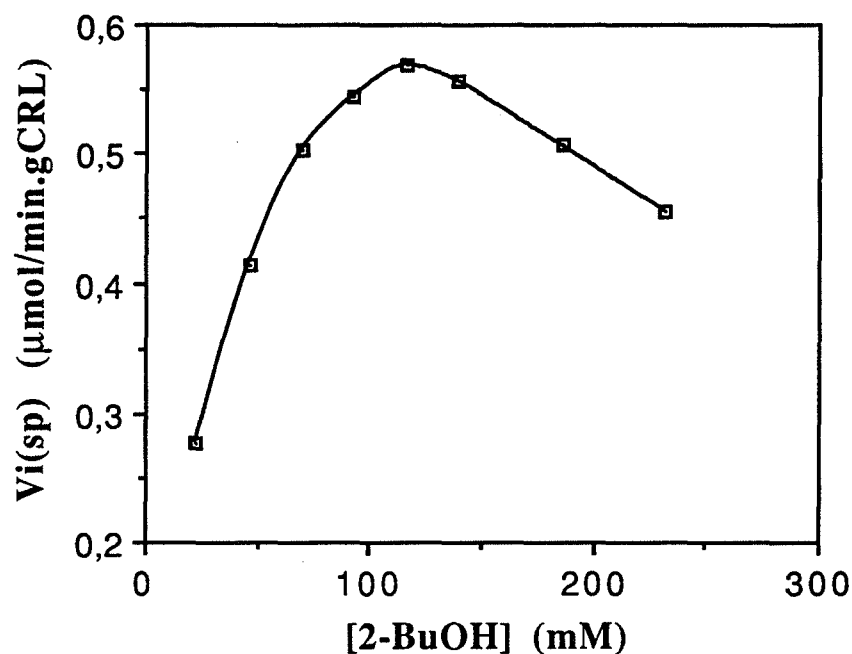
En étudiant la  $Vi(sp)$ , un maximum apparaît pour 116,1 mM de 2-BuOH (Figure D.2.1.2.b). Au-delà, la  $Vi(sp)$  diminue à cause de l'inhibition par excès de 2-BuOH.



**Figure D.2.1.2.a** : Evolution des taux de conversion avec la concentration en 2-butanol racémique.

*[BzOH] 50 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane 50/50.*

Le 2-BuOH, la CRL et les solvants sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.

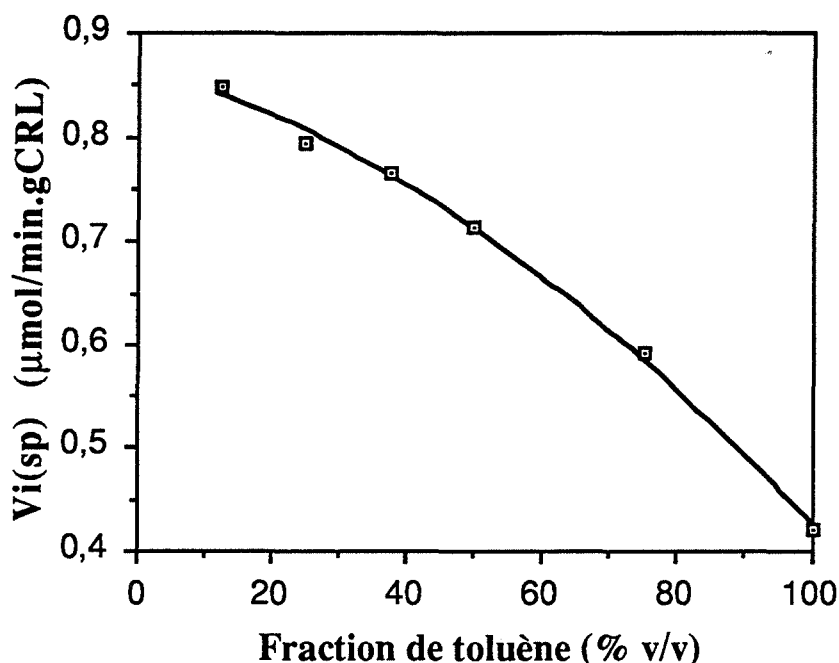


**Figure D.2.1.2.b** : Influence de la concentration en 2-butanol sur la vitesse initiale spécifique.

*Conditions identiques à la Figure D.2.1.2.a.*

L'inhibition par le 2-BuOH apparaît donc pour des concentrations en alcool légèrement plus élevées que celles du 1-BuOH. Dans les mêmes conditions opératoires, la  $V_i(sp)$  optimale est obtenue pour une concentration en 1-BuOH de 92,9 mM (cf paragraphe D.1.2.3.). Il faut toutefois signaler que les valeurs de  $V_i(sp)$  sont beaucoup plus faibles avec le 2-BuOH.

### D.2.2. Influence de la fraction de toluène dans le milieu organique sur la cinétique de réaction



**Figure D.2.2.a :** Evolution de la vitesse initiale spécifique en fonction de la fraction volumique de toluène.

[BzOH] 50 mM, [2-BuOH] 109,3 mM, CRL 10 g/l.

La CRL est pré-équilibrée à  $a_w$  0,65. Les solvants et le 2-BuOH sont utilisés sans pré-équilibrage.

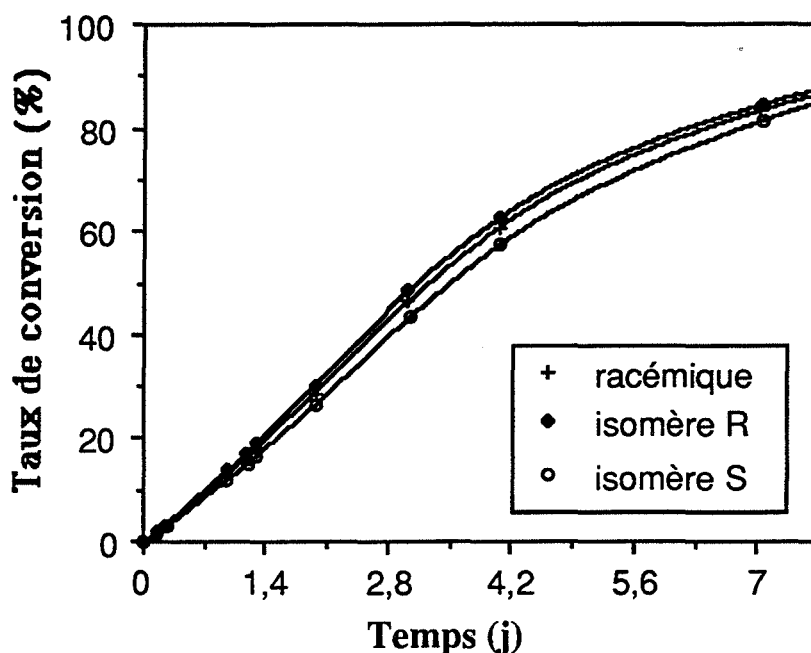
L'augmentation de la fraction volumique de toluène agit négativement sur la cinétique de formation du benzoate de 2-butyle (Figure D.2.2.a). Ceci corrobore les résultats obtenus avec le MeOH et le 1-BuOH. Par ailleurs, la décroissance de la  $V_i(sp)$  avec la fraction de toluène n'est pas linéaire, car les solvants n'ont pas été pré-équilibrés. La  $V_i(sp)$  est divisée par deux en passant d'un mélange hexane/toluène 90/10 à du toluène pur. Il faut également signaler, qu'en-dessous de 10%, une partie du BzOH a tendance à recristalliser.

Le toluène, nécessaire à la solubilisation de BzOH, est également un facteur limitant la réaction. Il ne semble pas intervenir directement sur la CRL. Ceci avait été mis en évidence avec le MeOH (cf paragraphe C.3.3.5.) et le 1-BuOH (cf paragraphe D.1.4.). D'après ces résultats, il agit principalement sur la répartition des substrats entre les différentes phases en présence

### D.2.3. Enantiosélectivité de la poudre enzymatique

#### D.2.3.1. Réactivité des isomères du 2-butanol

Le 2-BuOH, utilisé jusqu'à présent, est un mélange racémique des énantiomères R et S. Il est donc envisageable que la CRL favorise l'estérification de l'un des énantiomères du 2-BuOH.



**Figure D.2.3.1.a :** Influence de l'isomère du 2-butanol employé.

[BzOH] 50 mM, [2-BuOH] 109,3 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane 50/50.

La CRL et les solvants sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65. Les différents isomères du 2-BuOH sont prélevés directement dans leur flacon de stockage.

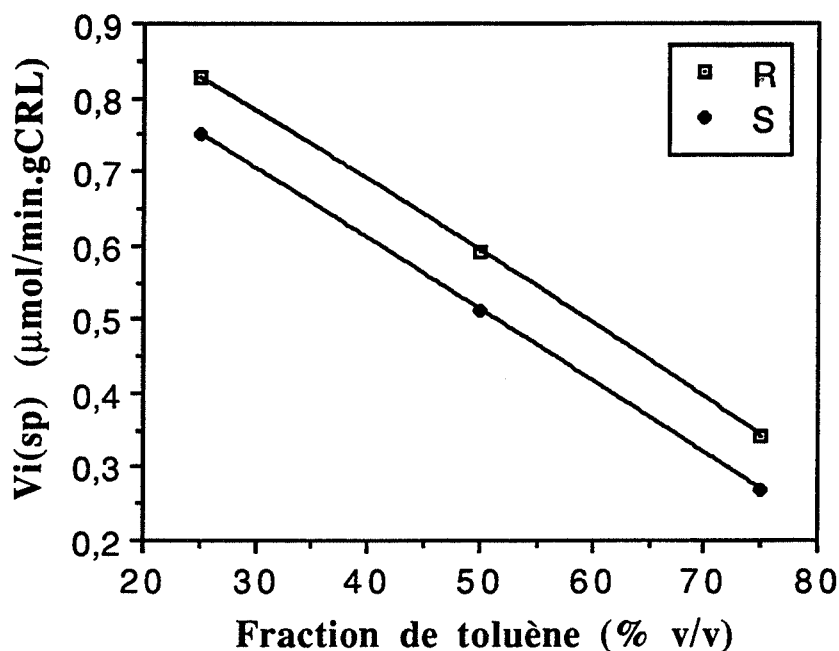
La configuration du 2-BuOH n'influe pas beaucoup sur la réaction (Figure D.2.3.1.a). En fait, l'énantiomère R réagit légèrement plus rapidement que l'isomère S. Il faut noter que le mélange racémique donne des résultats intermédiaires, proches de la moyenne des 2 isomères. La CRL ne permet pas une bonne résolution des deux stéréoisomères. Il est vrai que le 2-BuOH est l'alcool le plus petit comportant un carbone asymétrique. En particulier, la différence entre un groupe méthyle et un groupe éthyle est trop faible pour induire une sélectivité.

De même, il est connu que la lipase de *Candida rugosa* est en fait un mélange de plusieurs isoformes de stéréospécificité différente (Sih 1995).



### D.2.3.2. Influence de la fraction de toluène dans le milieu organique

Un moyen d'améliorer l'énantiosélectivité est de modifier la nature du solvant organique. Wu (1990) montre que l'hydrophobie du solvant affecte l'énantiosélectivité de la CRL. Dans notre cas, la variation de la fraction volumique de toluène affecte de la même façon la synthèse des deux énantiomères, n'induisant aucune amélioration de la stéréosélectivité de la CRL (Figures D.2.3.2.a et D.2.3.2.b).



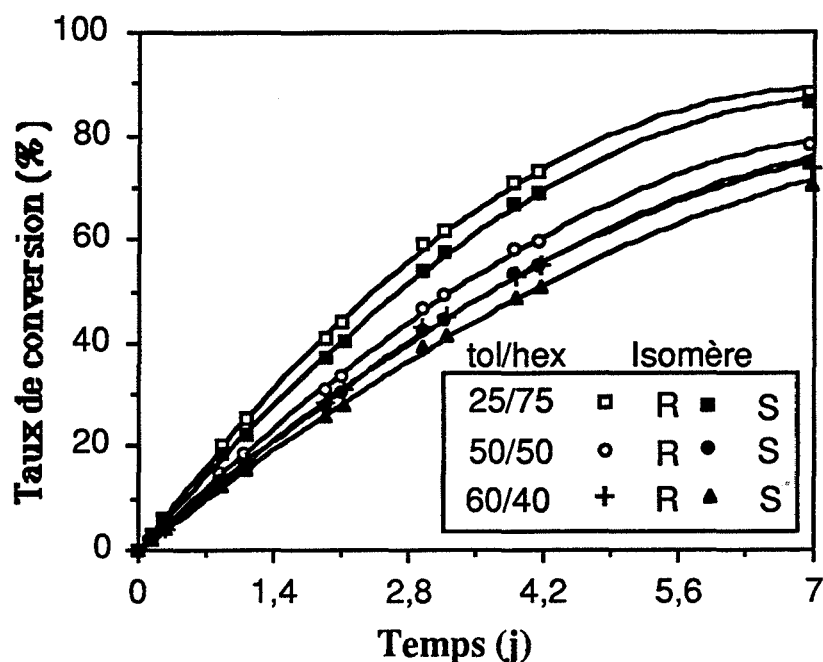
**Figure D.2.3.2.a :** Influence de la fraction volumique de toluène sur la vitesse initiale spécifique pour les 2 isomères du 2-butanol.

[BzOH] 50 mM, [2-BuOH] 109,3 mM, CRL 10 g/l.

La CRL et les solvants sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65. Les différents isomères du 2-BuOH sont prélevés directement dans leur flacon de stockage.

L'évolution de la réaction est également plus rapide dans des mélanges riches en hexane (Figure D.2.3.1.a). Ceci s'explique par les coefficients de partage des substrats dans les différents mélanges. De même, l'isomère R est légèrement plus réactif que l'isomère S, quelle que soit la proportion de solvant.

La stéréosélectivité n'est donc pas améliorée avec la modification de la proportion des solvants.



**Figure D.2.3.2.b :** Evolution des taux de conversion pour les 2 énantiomères du 2-butanol et différentes proportions en solvants.

[BzOH] 50 mM, [2-BuOH] 92,9 mM, CRL 10 g/l.

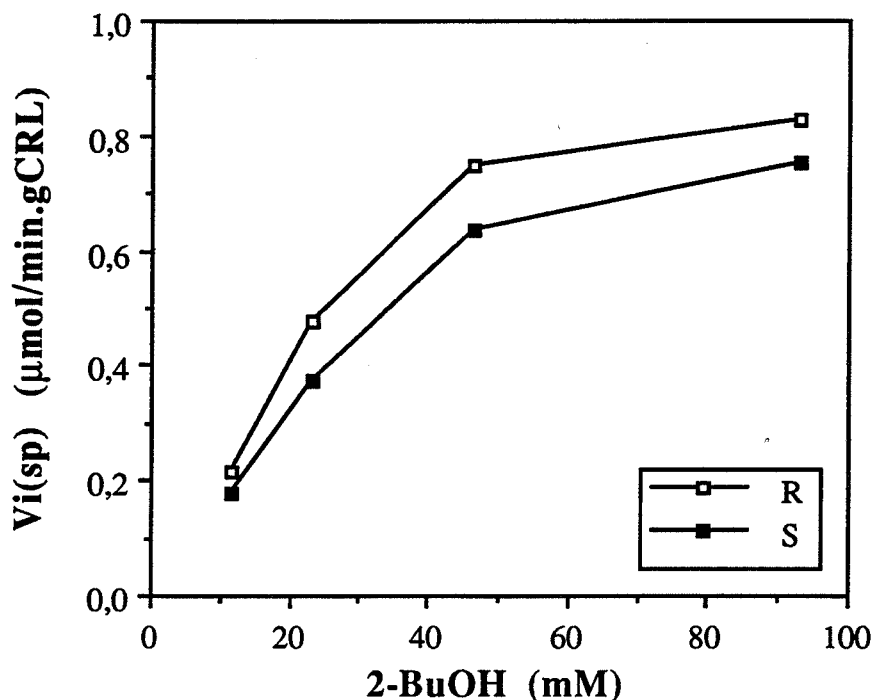
La CRL, les isomères du 2-butanol et les solvants sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.

Les courbes de  $V_i(sp)$  pour les 2 stéréoisomères ont une allure identique : la  $V_i(sp)$  diminue rapidement et linéairement avec l'augmentation de la fraction de toluène (Figure D.2.3.2.a). L'isomère R donne cependant des  $V_i(sp)$  environ 1,1 fois supérieures. La fraction volumique de toluène n'intervient donc pas initialement sur la stéréosélectivité de la CRL. Par contre, elle intervient sur la cinétique d'estérification. Ceci a déjà été mis en évidence avec d'autres alcools, tels le MeOH (cf paragraphe C.3.3.5.), le 1-BuOH (cf paragraphe D.1.4.) et le 2-BuOH racémique (cf paragraphe D.2.2.).

### D.2.3.3. Influence de la concentration en énantiomères sur la $V_i(sp)$

Diminuer la concentration en 2-BuOH (énantiomères R ou S) n'améliore pas de manière significative la stéréosélectivité de la réaction en début de réaction (Figure D.2.3.3.a). Ainsi, le rapport des vitesses initiales spécifiques augmente légèrement en diminuant la concentration en alcool. Cette amélioration est trop faible pour être intéressante.

Notre système enzymatique ne peut pas être utilisé pour réaliser une estérification énantiosélective du BzOH par le 2-BuOH. Comme il a déjà été noté, ceci provient, d'une part, de l'utilisation d'un petit alcool secondaire dont les groupements sont de taille voisine et, d'autre part, de la poudre catalytique, qui est connue pour comporter plusieurs isoformes de stéréosélectivité différente.



**Figure D.2.3.3.a** : Evolution de la vitesse initiale spécifique en fonction de la concentration en 2-BuOH (R ou S).

*[BzOH] 50 mM, CRL 10 g/l, toluène/hexane 25/75.*

La CRL, les isomères du 2-butanol et les solvants sont pré-équilibrés à  $a_w$  0,65.

### D.3. CONCLUSION DU CHAPITRE D

L'objectif du chapitre D a été en partie réalisé. En employant un alcool moins hydrophile et partiellement miscible à l'eau, tels les isomères du butanol, il est possible de travailler à activité en eau fixée au départ de la réaction et donc de permettre une modélisation de la  $V_i(sp)$ . Ceci est difficilement possible avec le MeOH. En particulier, dans ces conditions, les interactions eau adsorbée-BuOH sont limitées.

De même, il a été montré que le système catalytique mis en place pour la synthèse du benzoate de méthyle, peut être utilisé pour la synthèse d'autres benzoates, famille de molécules peu étudiée jusqu'à présent. Outre les benzoates de n-butyle et de 2-butyle, quelques essais non présentés dans cette étude ont montré la possibilité d'obtenir le benzoate d'iso-butyle avec des vitesses de réaction proches de celles observées pour le benzoate de 1-butyle. Par contre, le benzoate de tert-butyle n'est pas biosynthétisé à l'aide de ce système catalytique. La CRL, dans nos conditions, n'accepte pas le tertio-butanol, alcool tertiaire, comme substrat. La position de l'hydroxyle sur la chaîne carbonée de l'alcool influe grandement sur la cinétique de réaction. Pour les différents isomères du BuOH, l'estérification est favorisée avec les alcools primaires (n-BuOH et iso-BuOH), est possible

pour les alcools secondaires (les 2-BuOH) mais avec des cinétiques plus lentes, et est impossible avec l'alcool tertiaire (ter-BuOH).

La différence de réactivité entre les deux régio-isomères 1-BuOH et 2-BuOH est assez remarquable. La différence de positionnement de l'hydroxyle sur la chaîne butyle influence directement l'efficacité de la CRL.

Mais, d'un point de vue stéréosélectivité de la réaction, la CRL ne distingue pas les énantiomères du 2-BuOH. En effet, le 2-BuOH est un alcool trop petit et surtout avec deux chaînes trop peu différentes pour engendrer une préférence énantiomérique.

Plusieurs points mériteraient d'être développés :

- Il serait intéressant d'aborder l'influence de l'activité en eau dans le réacteur sur les constantes cinétiques. Ceci n'a pas pu être réalisé faute de temps.
- Il faudrait également s'assurer que la réaction n'est possible que dans un mélange toluène/hexane, en particulier ceci n'a pas été vérifié avec les isomères du butanol. Si c'est le cas, ceci signifie que l'acide benzoïque impose comme co-solvant le toluène. Si ce n'est pas le cas, il serait alors possible de généraliser l'étude avec d'autres solvants ou mélanges de solvants, pour savoir si ceux-ci agissent également sur la réaction par modification des valeurs des coefficients de partage de l'acide benzoïque.
- L'utilisation d'alcools, de masse moléculaire plus importante, permettrait de compléter cette étude : la faisabilité de la réaction avec des alcools comportant une chaîne carbonée plus longue, la régio et l'énantiosélectivité pour des isomères de position comportant des substitutions de taille très différente.



**CHAPITRE E**  
**CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



Des conditions de réaction ont été déterminées pour obtenir certains esters de l'acide benzoïque avec des taux de conversion supérieurs à 95% par catalyse enzymatique en milieu microaqueux. La réaction est catalysée par la lipase de *Candida rugosa* en suspension dans un milieu organique saturé en eau, composé d'hexane et de toluène. Les benzoates de méthyle, d'éthyle, de n-propyle, de 1-butyle, de 2-butyle et d'iso-butyle peuvent être synthétisés par ce système catalytique. La présence d'une quantité minimale de toluène dans le mélange est nécessaire pour solubiliser l'acide benzoïque.

L'eau est le facteur clé de la catalyse enzymatique en milieu microaqueux. La cinétique de réaction est dépendante de la teneur en eau dans le système et, surtout, au niveau de la lipase. En effet, un minimum d'eau est nécessaire pour observer la réaction, même si ceci ne suffit pas pour obtenir des vitesses de réaction optimales. Le manque d'eau se traduit, dans le cas des estérifications, par des cinétiques d'allure autocatalytique engendrées par la production d'eau au cours de la réaction. Avec 61,8 mM de MeOH, l'aspect autocatalytique disparaît à partir de 1000 mg d'eau ajoutée/l. Par contre, la présence d'une trop forte teneur en eau, pour laquelle le système est toujours microaqueux, aboutit au ralentissement de la réaction sans modifier la position de l'équilibre, même si la vitesse initiale est optimale. En effet, dans ce cas, des agrégats de CRL se forment au cours de la réaction limitant l'accès des substrats vers les sites catalytiques. La taille de ces agrégats augmente avec la teneur en eau. L'équilibre de la réaction est alors plus long à atteindre, mais celui-ci ne semble dépendre que de la solubilité de l'eau dans le milieu organique.

Afin d'étudier certains facteurs modifiant la teneur en eau dans les différentes phases du système, il est préférable de travailler avec un système catalytique pré-équilibré à une activité en eau donnée. Ceci permet de s'affranchir d'artefacts liés à une modification de la quantité d'eau présente au niveau de l'enzyme. En particulier, les facteurs teneur en CRL, concentration en alcool et proportion de toluène dans le milieu organique influencent grandement la répartition de l'eau dans le système.

La CRL accepte comme substrat l'acide benzoïque. Son action inhibitrice vis-à-vis de la CRL apparaît en l'absence d'eau. En revanche, en présence d'eau, aucune inhibition par excès de BzOH n'a été observée. Il semble même protéger la CRL des inhibitions par le méthanol.

Le méthanol est un inhibiteur de la CRL. Sa très grande hydrophilie empêche d'appliquer la méthode de pré-équilibrage à la synthèse du benzoate de méthyle et rend très difficile l'étude cinétique de cette réaction, car le méthanol intervient également sur la



désorption de la pellicule d'eau maintenant la CRL active. En effet, une interaction eau-méthanol apparaît pour des concentrations inférieures à 62 mM.

Le 1- et le 2-butanol inhibent la CRL pour des concentrations plus élevées. Ils ne sont que partiellement miscibles à l'eau, ce qui permet de travailler dans des systèmes catalytiques complètement pré-équilibrés. Les réactions avec le 1-butanol sont plus rapides qu'avec le méthanol et le 2-butanol. En particulier, la vitesse initiale spécifique avec le 1-butanol est au moins 4 fois plus élevée qu'avec le 2-butanol dans les mêmes conditions de réaction.

Quel que soit l'alcool utilisé (méthanol, 1- et 2-butanol), la nature du milieu organique affecte principalement la cinétique de réaction. En effet, la diminution de la vitesse initiale, proportionnellement à l'augmentation de la fraction de toluène dans le milieu organique, est attribuée à l'augmentation des coefficients de partage des substrats entre la phase organique et la pellicule aqueuse. Quelques différences selon la nature de l'alcool subsistent, en particulier la limite de solubilité de l'acide benzoïque dans le milieu organique et la présence ou non d'une vitesse optimale pour une proportion en toluène donnée.

La proportion de toluène dans le milieu organique affecte peu les taux de conversion finaux. Cependant, il vaut mieux travailler avec des proportions élevées en toluène pour avoir des meilleurs taux de conversion, mais les temps de réaction sont alors beaucoup plus élevés.

La teneur en CRL affecte la cinétique de réaction. Dans la mesure du possible, il est préférable de travailler avec un système totalement pré-équilibré à une activité en eau donnée. L'évolution des vitesses initiales spécifiques avec la teneur en CRL est fortement dépendante de l'apport d'eau et de la nature de l'alcool. Pour la synthèse du benzoate de méthyle, l'eau doit être apportée proportionnellement à la teneur en CRL pour observer une augmentation de la vitesse initiale spécifique avec l'augmentation de la teneur en CRL. Par contre, pour la synthèse du benzoate de 1-butyle, avec un système pré-équilibré à  $a_w$  0,65, la vitesse initiale spécifique est faiblement décroissante avec l'augmentation de la teneur en CRL. Cette différence est à relier avec le coefficient de partage de l'alcool entre la phase organique et l'eau. Si celui-ci est du même ordre de grandeur que le rapport des volumes de la pellicule aqueuse et de la phase organique, alors la vitesse initiale spécifique est dépendante du volume de la pellicule aqueuse et donc de la teneur en CRL pré-équilibrée (cas du méthanol). Sinon, s'il est très supérieur, alors la vitesse initiale spécifique est peu dépendante du volume de la pellicule aqueuse et donc de la teneur en CRL (cas du 1-butanol).

La modélisation de la cinétique a été réalisée pour l'estérification de l'acide benzoïque par le 1-butanol dans un système pré-équilibré à  $a_w$  0,65. Au-delà de 69,7 mM de 1-butanol, le modèle décrit correctement la cinétique de réaction avec les concentrations en substrats dans la phase organique. Les valeurs apparentes de  $V_m(sp)$ ,  $K_M(BzOH)$ ,  $K_M(BuOH)$  et  $K_i$  sont respectivement égales à 62  $\mu\text{mol}/\text{min.gCRL}$ , 335, 405 et 115 mM. En-dessous de

81,3 mM, un coefficient doit être introduit pour corriger la concentration en acide benzoïque dans la phase organique. La valeur de ce coefficient est inversement égal au coefficient de partage de l'acide benzoïque entre la phase organique et l'eau pour une concentration en 1-butanol donnée, et augmente avec la concentration en 1-butanol.

La CRL présente une faible stéréosélectivité pour les stéréoisomères du 2-butanol, car il y a peu de différences entre les chaînes méthyle et éthyle du carbone asymétrique.

Enfin, la stabilité de la CRL est relativement faible. La réutilisation entraîne une importante perte d'activité due en partie à une agglomération de la poudre enzymatique qui persiste après le séchage de la poudre.

Il faudrait poursuivre ce travail dans plusieurs directions.

Pour la synthèse du benzoate de méthyle, il semblerait possible de pré-équilibrer le système en introduisant une certaine quantité d'eau et en mesurant l'activité en eau au-dessus de la solution à l'aide d'un capteur d'humidité non sensible aux vapeurs de méthanol.

Pour la synthèse du benzoate de 1-butyle, faute de temps, nous n'avons pas étudié l'effet de l'ajout d'eau sur la cinétique de réaction.

Par ailleurs, nous nous sommes fixés une activité en eau de 0,65 pour la modélisation de la cinétique. Il serait intéressant d'étudier l'influence de ce paramètre sur la cinétique de réaction, sur les paramètres cinétiques et peut-être sur le coefficient correcteur de la concentration en acide benzoïque.

De même, l'étude cinétique n'a été réalisée qu'avec un mélange équivolumique hexane/toluène. En modifiant la proportion en solvants dans le milieu de réaction, nous pourrions voir l'influence de ce facteur sur les paramètres cinétiques, et ainsi déterminer l'influence des coefficients de partage des substrats sur les paramètres cinétiques (constantes d'affinité, constante d'inhibition de l'alcool, vitesse maximale).

Les résultats décevants vis-à-vis de l'énantiosélectivité de la CRL pour la synthèse du benzoate de 2-butyle attribués à une faible différence entre les deux énantiomères du 2-butanol pourront sans doute être améliorés en employant un alcool secondaire avec des chaînes latérales plus longues et différenciables par la CRL.

Les cinétiques observées avec la CRL sont plutôt lentes. Il faudrait peut-être trouver une autre enzyme ayant plus d'affinité pour l'acide benzoïque. D'un point de vue applications agroalimentaires, la présence de toluène est un frein pour un possible développement. Or, le criblage du milieu de réaction n'a été réalisé que pour la synthèse du

### *Conclusions et perspectives*

benzoate de méthyle. Avec d'autres alcools, nous n'avons pas vérifié si un autre solvant organique est possible.

Enfin, la perte d'activité rapide de la CRL obligera sans doute à une étape d'immobilisation. Ceci permettra également d'éliminer les phénomènes d'agglomération et facilitera la réutilisation de la CRL.

En résumé, les résultats obtenus sont proches des objectifs de départ. La synthèse des esters de l'acide benzoïque par catalyse enzymatique est réalisable avec de bons taux de conversion. Nous avons montré l'importance des différents coefficients de partage de tous les composants du système dans la compréhension des phénomènes cinétiques. De même, la façon d'apporter l'eau nécessaire à l'activité enzymatique peut expliquer certains phénomènes observés. Il est enfin préférable, si c'est possible, de travailler à activité en eau fixée dans tout le système.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- ADELHORST K., BJÖRKLING F., GODTFREDSEN S.E., KIRK O. (1990). Enzyme-catalyzed preparation of 6-O-acetylglucopyranosides. Synthesis : 112-115.
- ADLERCREUTZ P. (1991). On the importance of support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. Eur. J. Biochem., 199 : 609-614.
- ADLERCREUTZ P. (1995). Mode of using enzymes in organic media. In " Enzymatic reactions in organic media", A.M.P. Koskinen and A.M. Klivanov (eds), Blackie A & P, Glasgow : 9-42.
- AFFLECK R., HAYNES C.A., CLARK D.S. (1992). Solvent dielectric effects on protein dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 5167-5170.
- AHERN T.J., KLIBANOV A.M. (1985). The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. Science, 228 : 1280-1284.
- AMPON K., MEANS G.E. (1988). Immobilization of proteins on organic polymer beads. Biotechnol. Bioeng., 32 : 689-697.
- ARMSTRONG D.W., YAMAZAKI H. (1986). Natural flavours production : a biological approach. TIBTECH : 264-268.
- ARNOLD F.H. (1990). Engineering enzymes for non-aqueous solvents. TIBTECH : 244-249.
- BAR R. (1986). Phase toxicity in multiphase biocatalysis. TIBTECH, 4 : 167.
- BLANCO R.M., RAKELS J.L.L., GUIBAN J.M., HALLING P.J. (1992). Effect of thermodynamic water activity on amino-acid ester synthesis catalyzed by agarose-chymotrypsin in 3-pentanone. Biochim. Biophys. Acta, 1156 : 67-70.
- BOLAND W., FRÖBL C., LORENZ M. (1991). Esterolytic and lipolytic enzymes in organic synthesis. Synthesis : 1049-1072.
- BORNSCHEUER U., STAMATIS H., XENAKIS A., YAMANE T., KOLISIS F.N. (1994). A comparison of different strategies for lipase-catalysed synthesis of partial glycerides. Biotechnol. Lett., 16(7) : 697-702.
- BORZEIX CONÇAIX F. (1994). Stratégies de mise en oeuvre de la biocatalyse en milieu organique : étude de la lipase et de l'alcool oxydase. Thèse, Université de Provence Aix-Marseille I.
- BOSLEY J.A., CLAYTON J.C. (1994). Blueprint for a lipase support : use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. Biotechnol. Bioeng., 43 : 934-938.
- BOURQUELOT E., BRIDEL M. (1913). Synthèse des glucosides d'alcools à l'aide de l'émulsine et réversibilité des actions fermentaires. Ann. Chim. Phys., 29 : 145-218.
- BOVARA R., CARREA G., FERRARA L., RIVA S. (1991). Resolution of (±)-trans-sobrerol by lipase PS-catalyzed transesterification and effect of organic solvents on enantioselectivity. Tetrahedron : Asymmetry, 2(9) : 931-938.
- BRADY C., METCALFE L., SLABOSZEWSKI D., FRANK D. (1988). Lipase immobilized on a hydrophobic, microporous support for the hydrolysis of fats. J. Amer. Oil Chem. Soc., 65 : 917-921.
- BRADY L., BRZOWSKI A.M., DEREWENDA Z.S., DODSON E., DODSON G., TOLLEY S., TURKENBURG J.P., CHRISTIANSEN L., HUGE-JENSEN B., NORSKOV L., THIM L., MENGE U. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. Nature, 343 : 767-770.
- BURKE P.A., GRIFFIN R.G., KLIBANOV A.M. (1992). Solid-state NMR assessment of enzyme active center structure under nonaqueous conditions. J. Biol. Chem., 267 : 20057-20064.

BURKE P.A., GRIFFIN R.G., KLIBANOV A.M. (1993). Solid-state nuclear magnetic resonance investigation of solvent dependence of tyrosyl ring motion in an enzyme. Biotechnol. Bioeng., 42 : 87-94.

CARREA G., COLOMBI F., MAZZOLA G., CREMONESI P., ANTONINI E. (1979). Immobilized hydroxysteroid dehydrogenases for the transformation of steroids in water-organic solvent systems. Biotechnol. Bioeng., 21 : 38-48.

CARTA G., GAINER J.L., GIBSON M.E. (1992). Synthesis of esters using a nylon-immobilized lipase in batch and continuous reactor. Enzyme Microb. Technol., 14 : 904-910.

CHATTERJEE S., RUSSELL A.J. (1992). Determination of equilibrium and individual rate constants for subtilisin-catalyzed transesterification in anhydrous environments. Biotechnol. Bioeng., 40 : 1069-1077.

CHAVANNE M., JULLIEN A., BEAUDOIN G.J., FLAMAND E. (1986). Préparation du benzoate de méthyle. In "Chimie organique expérimentale", Modulo Editeur, Québec, 570-572.

CHE OMAR I., NISHIO N., NAGAI S. (1988). The role of water on the equilibrium of esterification by immobilized lipase packed-bed column reactor. Biotechnol. Lett., 10(11) : 799-804.

CHIN J.T., WHEELER S.L., KLIBANOV A.M. (1994). On protein solubility in organic solvents. Biotechnol. Bioeng., 44 : 140-145.

CHULALAKSANANUKUL W., CONDORET J.S., DELORME P., WILLEMOT R.M. (1990). Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. FEBS Lett., 276 : 181-184.

CHULALAKSANANUKUL W., CONDORET J.S., COMBES D. (1992). Kinetics of geranyl acetate synthesis by lipase-catalysed transesterification in n-hexane. Enzyme Microb. Technol., 14 : 293-298.

CHULALAKSANANUKUL W., CONDORET J.S., COMBES D. (1993). Geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in supercritical carbon dioxide. Enzyme Microb. Technol., 15 : 691-698.

CREMONESI P., CARREA G., FERRARA L., ANTONINI E. (1975). Enzymatic preparation of 20 $\beta$ -hydroxysteroid in two-phase system. Biotechnol. Bioeng., 17 : 1101-1108.

DASTOLI F.R., MUSTO N.A., PRICE S. (1966). Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in an organic medium. Arch. Biochem. Biophys., 115 : 44-47.

DASTOLI F.R., PRICE S. (1967). Catalysis by xanthine oxidase suspended in organic media. Arch. Biochem. Biophys., 118 : 163-165.

DAUBERT T.E., DANNER R.P. (1985). In "Data compilation tables of properties of pure compounds", Am. Inst. Chem. Engineers, New-York.

DE GOEDE A.T.J.W., VAN OOSTEROM M., VAN DEURZEN M.P.J., SHELDON R.A., VAN BEKKUM H., VAN RANTWIJK F. (1994). Selective lipase catalyzed esterification of alkylglucosides. Biocatalysis, 9 : 145-155.

DESNUELLE P., SARDA L., AILHAUD G. (1961). Inhibition de la lipase pancréatique par la diéthyl-p-nitrophényl phosphate émulsion. Biochim. Biophys. Acta, 37 : 570-571.

DORDICK J.S. (1989). Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. Enzyme Microb. Technol., 11 : 194-211.

DORDICK J.S. (1992). Enzymatic and chemoenzymatic approaches to polymer synthesis. TIBTECH, 10 : 187-293.

ENGEL K.H. (1992). Lipase-catalyzed enantioselective acidolysis of chiral 2-methylalkanoates. J. Amer. Oil Chem. Soc., 69 : 146-150.

EGGERS D.K., BLANCH H.W., PRAUSNITZ J.M. (1989). Extractive catalysis : solvent effects on enzymatic reactions in two-phase systems. Enzyme Microb. Technol., 11 : 84-89.

FABER K., FANSEN M.C.R. (1993). Prospects for the increased application of biocatalysts in organic transformations. TIBTECH, 11 : 461-470.

FITZPATRICK P.A., STEINMETZ A.C.U., RINGE D., KLIBANOV A.M. (1993). Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 90 : 8653-8657.

FONTÉYN F.M., BLEDZER C., LOGNOY G., MARLIER M., SEVERIN M. (1994). Optimization of lipase catalyzed synthesis of citronellyl acetate in solvent-free medium. Biotechnol. Lett., 16 : 693-696.

FULCRAND V., JACQUIER R., LAZARO R., VIALLEFONT P. (1991). Enzymatic peptide synthesis in organic solvent mediated by gels of copolymerized acrylic derivatives of  $\alpha$ -chymotrypsin and polyoxyethylene. Int. J. Peptide Protein Res., 38 : 273-277.

GOLDBERG M., THOMAS D., LEGOY M-D. (1990). The control of lipase-catalysed transesterification reaction rates. Effect of substrate polarity, water activity and water molecules on enzyme activity. Eur. J. Biochem., 190 : 603-609.

GORMAN L.A.S., DORDICK J.S. (1992). Organic solvent strip water off enzymes. Biotechnol. Bioeng., 39 : 392-397.

GOUPY P. (1988). Les plans d'expériences, ed Dunod.

HABULIN M., KNEZ Z. (1993). Influence of reaction parameters on synthesis of n-butyl oleate by immobilized *Mucor miehei* lipase. Fat Sci. Technol., 95(7) : 249-252.

HALLING P.J. (1987). Biocatalysis in multi-phase reaction mixtures containing organic liquids. Biotechnol. Adv., 5 : 47-84.

HALLING P.J. (1989a). Organic liquids and biocatalysts : theory and practice. TIBTECH, 7 : 50-51.

HALLING P.J. (1989b). Solvent selection for biocatalysis in organic systems : predictions of effects on equilibrium position. Biotechnol. Bioeng., 35 : 691-701.

HALLING P.J. (1990). High-affinity binding of water by proteins is similar in air and in organic solvents. Biochim. Biophys. Acta, 1040 : 225-228.

HALLING P.J. (1992). Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. Biotechnol. Techniques, 6 : 271-276.

HARBRON S., SMITH B.W., LILLY M.D. (1986). Two-liquid phase biocatalysis : epoxidation of 1,7-octadiene by *Pseudomonas putida*. Enzyme Microb. Technol., 8 : 85-88.

INADA Y., TAKAHASHI K., YOSHIMOTO T., AJIMA A., MATSUSHIMA A., SAITO Y. (1986). Application of polyethylene glycol-modified enzymes in biotechnological processes : organic solvent-soluble enzymes. TIBTECH : 190-194.

IWAI M., TSUJISAKA M., FUKUMOTO J. (1964). Studies on lipase : hydrolytic and esterifying actions of crystalline lipase of *Aspergillus Niger*. J. Gen. Appl. Microbiol., 110 : 13-22.

IWAI M., OKUMURA S., TSUJISAKA Y. (1975). The comparison of the properties of the two lipases from *Penicillium cyclopium*. Agri. biol. Chem., 39 : 1063-1070.



IWAI M., OKUMURA S., TSUJISAKA Y. (1980). Synthesis of terpenic alcohol esters by lipase. Agri. Biol. Chem., 44 : 2731-2732.

JENSEN B.H., GALLUZZO D.R., JENSEN R.G. (1987). Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. Lipids, 22 : 559-565.

KASCHE V., MICHAELIS G., GALUNSKY B. (1991). Binding of organic solvent molecules influences the P<sub>1</sub>'-P<sub>2</sub>' stereo- and sequence-specificity of  $\alpha$ -chymotrypsin in kinetically controlled peptide synthesis. Biotechnol. Lett., 13 : 75-80.

KAZANDJIAN R.Z., KLIBANOV A.M. (1985). Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform. J. Am. Chem. Soc., 107 : 5448-5550.

KAZLAUSKAS R.J. (1994). Elucidating structure-mechanism relationships in lipases : prospects for predicting and engineering catalytic properties. TIBTECH, 12 : 464-472.

KHAN S.A., HALLING P.J., BOSLEY J.A., CLARK A.H., PELOW A.D., PELAN E.G., ROWLANDS D.W. (1992). Polyethylene glycol-modified subtilisin forms microparticulate suspensions in organic solvents. Enzyme Microb. Technol., 14 : 96-100.

KHMELNITSKY Y.L., DIEN F.K., SEMENOV A.M., MARTINEK K., VERVOVIC B., KUBANEK V. (1984). Optimisation of enzyme catalysed peptide synthesis in a "water-water-immiscible organic solvent" biphasic system. Tetrahedron, 40 : 4425-4432.

KHMELNITSKY Y.L., ZHARINOVA I.N., BREZIN I.V., LEVASHOV A.V., MARTINEK K. (1987). Detergent microemulsions. A new microheterogeneous medium for enzymatic reaction. In "Enzyme engineering 8". Laskin A.I., Mosbach K., Thomas D., Wingard L.B.J. eds, Ann. NY. Acad. Sci. 501 : 161-164.

KHMELNITSKY Y.L., LEVASHOV A.V., KLYACHKO N.L., MARTINEK K. (1988). Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. Enzyme Microb. Technol., 10 : 710-724.

KHMELNITSKY Y., MOZHAEV V., BELOVA A., SERGEEVA M., MARTINEK K. (1991a). Denaturation capacity : a new criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. Eur. J. Biochem., 198, 31-41.

KHMELNITSKY Y.L., BELOVA A.B., LEVASHOV A.V., MOZHAEV V.V. (1991b). Relationship between surface hydrophobicity of a protein and its stability against denaturation by organic solvents. FEBS Lett., 284 : 267-269.

KILARA A. (1985). Enzyme-modified lipid food ingredients. Process Biochemistry : 35-45.

KIM S.B., CHOI C.Y. (1995). Effect of solid salt hydrates on the asymmetric esterification of 2-chloropropionic acid : control of water activity in organic solvent. Biotechnol. Lett., 17(10) : 1075-1076.

KLIBANOV A.M., SAMOKHIN G.P., MARTINEK K., BEREZIN I. (1977). A new approach to preparative enzymatic synthesis. Biotechnol. Bioeng., 19 : 1351-1361.

KLIBANOV A.M., KÜCHNER G. (1986). Enzymatic production of 2-halopropionic acids, US patent 4,601,987 in Massachusetts Institute of Technology.

KLIBANOV A.M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. Trends Biochem. Sci., 14 : 141-144.

KNEZ Z., LEITGEB M., ZAVRSNIK D., LAVRIC B. (1990). Synthesis of oleic acid esters with immobilized lipase. Fat Sci. Technol., 92(4) : 169-172.

KODERA Y., TAKAHASHI K., NISHIMURA H., MATSUSHINA A., SAITO Y., INADA Y. (1986). Ester synthesis from  $\alpha$ -substituted carboxylic acid catalyzed by

polyethylene glycol-modified lipase from *Candida rugosa* in benzene. Biotechnol. Lett., 8(12) : 881-884.

KVITTINGEN L., SJURNES B., ANTHONSEN T., HALLING P.J. (1992). Salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media : a practical procedure for organic chemists. Tetrahedron, 48 : 2793-2802.

KWEI G. (1992). In "Ethel Browning's toxicity and metabolism of industrial solvents", second ed, vol. 3 : Alcohols and esters : 376-379.

LAANE C., BOEREN S., VOS K., VEEGER C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng., 30 : 81-87.

LAMARE S., LEGOY M-D. (1993). Biocatalysis in the gas phase. TIBTECH, 11 : 413-418.

LAMARE S., LEGOY M-D. (1995). Working at controlled water activity in a continuous process : the gas/solid system as a solution. Biotechnol. Bioeng., 45 : 387-397.

LANGRAND G., RONDOT N., TRIANTAPHYLIDES C., BARRATTI J. (1990). Short chain flavour ester synthesis by microbial lipases. Biotechnol. Lett., 12(8) : 581-586.

LIU W.R., LANGER R.L., KLIBANOV A.M. (1991). Moisture-induced aggregation of lyophilized proteins in the solid state. Biotechnol. Bioeng., 37 : 177-184.

LUISI P.L., LÜTHI P., TOMKA I., PRENOSIL E., PANDE A. (1984). Hydrocarbon micellar solutions in enzymatic reactions of apolar compounds. Ann. NY. Acad. Sci., 434 : 549-557.

LUISI P.L., LAANE C. (1986). Solubilization of enzymes in apolar solvents via reverse micelles. TIBTECH, 4 : 153-161.

LUISI P.L., STRAUB B.E.(EDS) (1994). Reverse micelles. Plenum Press, New-York.

LUTZ D., HUFFER M., GERLACH D., SCHREIER P. (1992). Carboxyester-lipase mediated reactions : a versatile route to chiral molecules. In "Flavour precursors". Teranishi R., Takeoka G.R., Güntert M. eds. American Chemical Society, Washington DC, 32-45.

MACRAE A.R. (1985). Interesterification of fats and oils. In "Biocatalysts in organic synthesis". Tramper J., van der Plas H.C., Linko P. eds, Elsevier, Amsterdam : 195-208.

MALCATA F.X., REYES H.R., GARCIA H.S., HILL JR C.G., AMUNDSON C.H. (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. Enzyme Microb. Technol., 14 : 426-446.

MANJON A., IBORRA J.L., AROCAS A. (1991). Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. Biotechnol. Lett., 13 : 339-344.

MARTY A., COMBES D., CONDORET J.S. (1994). Continuous reaction separation process for enzymatic esterification in supercritical carbon dioxide. Biotechnol. Bioeng., 43 : 497-504.

MARTINEK K., SEMENOV A.N., BEREZIN I.V. (1981). Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. Biochim. Biophys. Acta, 658 : 76-89.

MARTINEK K., KLYACHKO N.L., KABANOV A.V., KHMELNITSKY Y.L., LEVASHOV A.V. (1989). Micellar enzymology : its relation to membranology. Biochim. Biophys. Acta, 981 : 161-172.

MATTIASSEN B., ADLERCREUTZ P. (1991). Tailoring the microenvironment of enzymes in water-poor systems. TIBTECH, 9 : 394-398.

MONOT F., BORZEIX F., BARDIN M., VANDECASTEELE J.P. (1991). Enzymatic esterification in organic media : role of water and organic solvent in kinetics and yields of butyl butyrate synthesis. Appl. Microbiol. Biotechnol., 35 : 759-765.

MONOT F., PACCARD E., BORZEIX F., BARDIN M., VANDECASTEELE J.P. (1993). Effect of lipase conditioning on its activity in organic media. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39 : 483-486.

MORTON I.D., MACLEOD A.J. (1990). Food flavours, part C, The flavours of fruits, Elsevier, Amsterdam.

MOSKOWITZ G.J., CASSAIGNE R., WEST I.R., SHEN T., FELDMAN L.I. (1977). Hydrolysis of animal fat and vegetable oil with *Mucor miehei* esterase. Properties of the enzyme. J. Agric. Food. Chem., 25 : 1146-1150.

NAKAMURA K. (1990). Biochemical reaction in supercritical fluids. TIBTECH, 8 : 288-292.

NORIN M., BOUTELJE J., HOLMBERG E., HULT K. (1988). Lipase immobilized by adsorption. Effect of support hydrophobicity on the reaction rate of ester synthesis in cyclohexane. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28 : 527-530.

OLLIS D.L. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. Prot. Eng., 5 : 197-211.

OTAMARI M., ADLERCREUTZ P., MATTIASSON B. (1992a). Complex formation between chymotrypsin and ethyl cellulose as a means to solubilize the enzyme in active form in toluene. Biocatalysis, 6 : 291-305.

OTAMARI M., ADLERCREUTZ P., MATTIASSON B. (1992b). Complex formation between chymotrypsin and polymers as a means to improve exposure of the enzyme to organic solvents. In "Biocatalysis in non-conventional media". Tramper J., Vermüe M., Beeftink H.H., von Stokar U. eds, Elsevier, Amsterdam : 363-369.

PARVARESH F., ROBERT H., THOMAS D., LEGOY M-D. (1992). Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. Biotechnol. Bioeng., 39 : 467-473.

PERRAUD R., LABORET F. (1995). Optimization of methyl propionate production catalysed by *Mucor miehei* lipase. Appl. Microb. Biotechnol., 44 : 321-326.

PULVIN S., LEGOY M-D., LORTIE R., PENSA M., THOMAS D. (1986). Enzyme technology and gas phase catalysis : alcohol dehydrogenase example. Biotechnol. Lett., 8 : 783-784.

RACKELS J.L.L., CAILLAT P., STRAATHOF A.J.J., HEIJNEN J.J. (1994). Modification of the enzymatic enantioselectivity by product inhibition. Biotechnol. Prog., 10 : 403-409.

RAMELMEIER R.A., BLANCH H.W. (1989). Mass transfer and cholesterol oxidase kinetics in a liquid-liquid two-phase system. Biocatalysis, 2 : 97-120.

RAZAFINDRALAMBO H., BLECKER C., LOGNAY G., MARLIER M., WATHELET J.P., SEVERIN M. (1994). Improvement of enzymatic synthesis yields of flavour acetates : the example of the isoamyl acetate. Biotechnol. Lett., 16(3) : 247-250.

REKKER R.F. (1977). The hydrophobic fragmental constant, Elsevier, Amsterdam.

RESLOW M., ADLERCREUTZ P., MATTIASSON B. (1987). Organic solvents for bioorganic synthesis 1. Optimization of parameters for  $\alpha$ -chymotrypsin catalyzed process. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26 : 1-8.

RESLOW M., ADLERCREUTZ P., MATTIASSON B. (1988). On the importance of the support material for bioorganic synthesis. Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-poor reaction media. Eur. J. Biochem., 172 : 573-578.

ROSEVEAR A., KENNEDY J.F., CABRAL J.M.S. (1987). Immobilized Enzymes and cells. Adam Hilger ed, Bristol.

RUCKENSTEIN E., WANG X. (1993). Lipase immobilized on porous polymer supports prepared by concentrated emulsion polymerisation and their activity in the hydrolysis of triacyl-glycerides. Biotechnol. Bioeng., 42 : 821-828.

RUPLEY J.A., GRATTON E., CARERI G. (1983). Water and globular proteins. TIBS : 18-22.

RUPLEY J.A., CARERI G. (1991). Protein hydration and function. Adv. Prot. Chem., 41 : 37-172.

RUSSELL A.J., KLIBANOV A.M. (1988). Inhibitor-induced enzyme activation in organic solvents. J. Biol. Chem., 263 : 11624-11626.

SECUNDO F., RIVA S., CARREA G. (1992). Effect of medium and of reaction conditions on the enantioselectivity of lipases in organic solvents and possible rationales. Tetrahedron : Asymetry, 3 : 267-280.

SUGIURA M., ISOBE M. (1975). Studies on the mechanism of the lipase reaction : comparative studies on the adsorption of lipases on various proteins at the air-water interface. Biochim. Biophys. Acta, 397 : 412-417.

SIH C.J., GIRDAUKAS G., CHEN C-S., SIH J.C. (1995). Enzymatic resolutions of alcohols, esters, and nitrogen-containing compounds. In "Enzymatic reactions in organic media". Koskinen A.M.P., Klibanov A.M. eds, Blackie Academic & Professional, Glasgow : 94-139.

SINGER S.J. (1962). The properties of proteins in non-aqueous solvents. Adv. Protein Chem., 17 : 1-68.

STAHL M., MANSSON M-O., MOSHBACH K. (1990). The synthesis of a D-amino acid ester in an organic medium with  $\alpha$ -chymotrypsin modified by a bio-imprinting procedure. Biotechnol. Lett., 12 : 161-166.

TAKAHASHI K., YOSHIMOTO T., AJIMA A., TAMAURA Y., INADA Y. (1984). Modified lipoprotein lipase catalyzes ester synthesis in benzene. Enzyme, 32 : 235-240.

TAKAHASHI K., SALTO Y., INADA Y. (1988). Lipase made active in hydrophobic media. J. Amer. Oil Chem. Soc., 65(6) : 911-916.

TANFORD C. (1980). The hydrophobic effect. Wiley, New York.

THE MERCK INDEX (1989). 11<sup>th</sup> edition, Budavari S., ed. n°1101 : 170-171.

TSUJISAKA Y., OKUMURA S., IWAI M. (1977). Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipase. Biochim. Biophys. Acta, 489 : 415-422.

VALIVETY R.H., HALLING P.J., MACRAE A.R. (1992a). *Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001. FEBS Lett., 301 : 258-260.

VALIVETY R.H., HALLING P.J., PEILOW A.D., MACRAE A.R. (1992b). Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. Biochim. Biophys. Acta, 1122 : 143-146.

VALIVETY R.H., HALLING P.J., MACRAE A.R. (1992c). Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. Biochim. Biophys. Acta, 1118 : 218-222.

VALIVETY R.H., HALLING P.J., MACRAE A.R. (1993). Water as a competitive inhibitor of lipase-catalysed esterification in organic media. Biotechnol. Lett., 15(11) : 1133-1138.

VERGER R. (1984). In "Lipases". Elsevier, Amsterdam : 83-150.

VOLKIN D.B., STAUBLI A., LANGER R., KLIBANOV A.M. (1991). Enzyme thermoinactivation in anhydrous organic solvents. Biotechnol. Bioeng., 37 : 843-853.

VOLKIN D.B., MARCH H., MIDDAUGH C.R. (1995). Degradative covalent reactions important to protein stability. In "Methods in molecular biology : protein stability and folding protocols". Shirley B.A. ed, Humana press Inc, Totowa, NJ, 40.

WAN YUNUS W.M.Z., SALLEH A.B., ISMAIL A., RAZAK C.N.A., BASRI M. (1992). Poly(methyl methacrylate) as a matrix for immobilisation of lipase. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36 : 97-105.

WEHTJE E. (1992). Parameters influencing enzyme activity in organic media. PhD thesis. Lund University, Lund, Sweden.

WEHTJE E., ADLERCREUTZ P., MATTIASSON B. (1993). Improved activity retention of enzymes deposited on solid supports. Biotechnol. Bioeng., 141 : 171-178.

WELSH F.W., WILLIAMS R.E., DAWSON K.H. (1990). Lipase mediated synthesis of low molecular weight flavor esters. J. Food Sci., 55(6) : 1679-1682.

WESCOTT C.R., KLIBANOV A.M. (1993). Solvent variation inverts substrate specificity of an enzyme. J. Am. Chem. Soc., 115 : 1629-1631.

WISDOM R.A., DUNNIL P., LILLY M.D. (1984). Enzymatic interesterification of fats : factors influencing the choice of the support for immobilized lipase. Enzyme Microb. Technol., 6 : 443-446.

WU S.H., GUO Z.W., SIH C.J. (1990). Enhancing the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase catalyzed ester hydrolysis via noncovalent enzyme modification. J. Am. Chem. Soc., 112 : 1990-1995.

YAMANE T. (1987). Enzyme technology for the lipid industry : an engineering overview. J. Am. Oil. Chem. Soc., 64 : 1657-1662.

YAMANE T. (1988). Importance of moisture content control for enzymatic reactions in organic solvents : a novel concept of microaqueous. Biocatalysis, 2 : 1-9.

YAMANE T., KOJIMA Y., ICHIRYU T., NAGATA M., SHIMIZU S. (1989). Intramolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene : effect of moisture content. Biotechnol. Bioeng., 34 : 838-843.

YAMANE T., ICHIRYU T., NAGATA M., UENO A., SHIMIZU S. (1990). Intramolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene : facteur affecting activity of pure enzyme. Biotechnol. Bioeng., 36 : 1063-1069.

YANG Z., ROBB D.A. (1991). Enzyme activity in organic media. Biochem. Soc., 20 : 13.

YANG Z., ZACHERL D., RUSSELL A.J. (1993). pH dependence of subtilisin dispersed in organic solvents. J. Am. Chem. Soc., 115 : 12251-12257.

YENNAWAR H.P., YENNAWAR N.H., FARBER G.K. (1994). X-ray crystal structure of  $\gamma$ -chymotrypsin in hexane. Biochemistry, 33 : 7326-7336.

ZAKS A., KLIBANOV A.M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. Science, 224 : 1249-1251.

ZAKS A., KLIBANOV A.M. (1985). Enzyme-catalysed processes in organic solvents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 : 3192-3196.

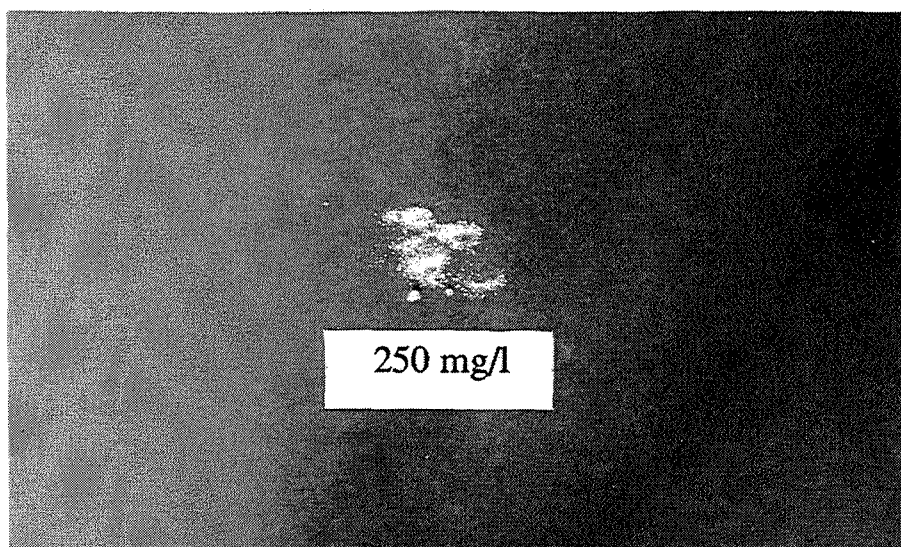
ZAKS A., KLIBANOV A.M. (1986). Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs water is reversed. J. Am. Chem. Soc., 108 : 2767-2768.

ZAKS A., KLIBANOV A.M. (1988a). Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents. J. Biol. Chem., 263 : 3194-3201.

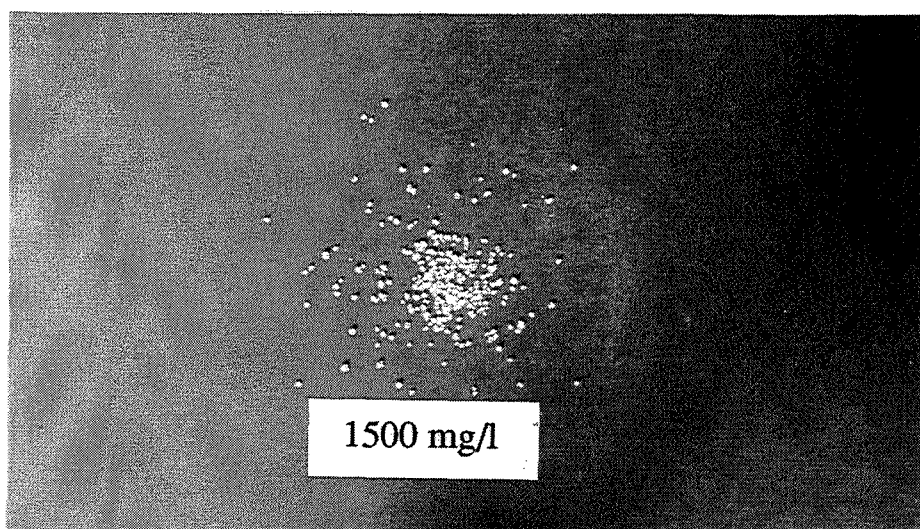
ZAKS A., KLIBANOV A.M. (1988b). The effect of water on enzyme action in organic media. J. Biol. Chem., 263 : 8017-8021.

## **ANNEXE**

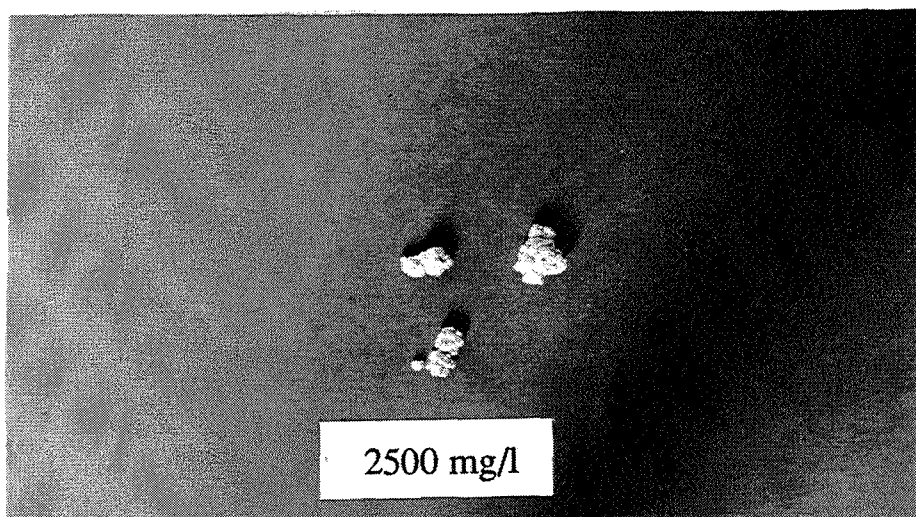




**Photo 1** : Aspect de la poudre de CRL en fin de réaction avec 250 mg d'eau ajoutée/l.



**Photo 2** : Aspect de la poudre de CRL en fin de réaction avec 1500 mg d'eau ajoutée/l.



**Photo 3** : Aspect de la poudre de CRL en fin de réaction avec 2500 mg d'eau ajoutée/l.







n° d'ordre : 180 CD

NOM : Jean-Pierre LESZCZAK

SUJET : Synthèse d'esters de l'acide benzoïque par catalyse enzymatique en milieu hétérogène microaqueux.

SPECIALITE : Génie des Procédés

MOTS CLES : Catalyse enzymatique - milieu organique microaqueux - bioestérification - acide benzoïque - lipase de *Candida rugosa*

RESUME :

La synthèse d'esters de l'acide benzoïque par voie enzymatique en milieu hétérogène microaqueux est envisagée. Cette estérification est possible et est catalysée par la lipase de *Candida rugosa* en suspension dans un mélange hexane/toluène. Le toluène permet la solubilisation de l'acide benzoïque.

De nombreux paramètres influencent la synthèse des benzoates de méthyle et de butyle. La teneur en eau initiale agit uniquement sur la cinétique de réaction en affectant l'aspect de la poudre enzymatique sans modifier de manière notable la position de l'équilibre de réaction. Il est préférable, dans la mesure du possible, de travailler à une activité en eau fixée au départ pour s'affranchir d'artefacts liés à la désorption de la pellicule aqueuse entourant les grains d'enzyme. Une approche par les plans d'expériences montre l'influence de plusieurs paramètres et de certaines interactions entre facteurs sur la cinétique et sur l'évolution de la réaction. La vitesse initiale spécifique décroît linéairement avec la fraction de toluène dans des milieux organiques contenant plus de 40% de toluène. Par contre, la variation de la  $V_i(sp)$  avec la teneur en enzyme est dépendante de la nature de l'alcool et de sa concentration. Les effets de la proportion de toluène dans le mélange et de la teneur en enzyme sont expliqués par la variation de la concentration en substrats dans la pellicule aqueuse entourant l'enzyme.

La vitesse initiale de production du benzoate de 1-butyle est modélisée et réalisée dans un mélange équimolaire hexane/toluène à une activité en eau initiale de 0,65. La cinétique suit un schéma réactionnel de type Bi Bi Ping-Pong avec inhibition par l'alcool si les concentrations en substrats dans la pellicule aqueuse sont prises en compte. En particulier, la concentration en acide benzoïque dans cette phase est dépendante de la concentration en 1-butanol.

Ce travail démontre que la technique d'ajout d'eau dans le système, la variation des coefficients de partage des substrats entre milieu organique et pellicule aqueuse, la nature de l'alcool et les phénomènes d'inhibition par les alcools permettent d'expliquer les variations de vitesses initiales spécifiques.

Enfin, ce système catalytique permet d'obtenir ces benzoates avec des taux de conversion supérieurs à 95% et peut être employé à la synthèse d'autres benzoates.